T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

BAZI FUNGİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *Drosophila* SMART YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Özlem SAYGIN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKİM 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

BAZI FUNGİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *Drosophila* SMART YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Özlem SAYGIN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKİM 2019

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI FUNGİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *Drosophila* SMART YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Özlem **SAYGIN**

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 18/10/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN

Prof. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ

ÖZET

BAZI FUNGİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *Drosophila* SMART YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Özlem SAYGIN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA

Ekim 2019; 97 sayfa

Gıda ihtiyacı ve ekonomik sebeplerle, tarımda verimi artırmak, zararlılarla mücadele etmek ve ürünlerin çabuk bozulmalarını önlemek için pestisit kullanmak gerekmektedir. Kullanılan bu pestisitler, bazen hedef dışı organizmalara negatif etkileri, çevre kirliliği oluşturması, besinler üzerindeki kalıntıları nedeniyle insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Bunun yanı sıra, organizmaların zamanla pestisitlere karşı direnç kazanabilmesi sebebiyle yeni ve güvenli pestisit geliştirme çalışmaları sürekli olarak devam etmektedir.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın verilerine göre ülkemizde son 10 yılda pestisit olarak en çok kullanılan kimyasallar fungisitler olmuştur. Bu nedenle bu çalışmada ülkemizde fungus kontrolünde yaygın olarak kullanılan dört fungisitin (Metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl) genotoksik etkileri model organizma *Drosophila melanogaster* ile yapılan *in vivo* kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Bu test sisteminde, 72±4 saatlik transheterozigot larvalar fungisit içeren *Drosophila* hazır besini ile 48 saat boyunca kronik maruziyete bırakılmıştır. Çalışmada *mwh*/*mwh* ve flr^3/*TM3*, Bd^s genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Çalışılan bütün fungisitler suda çözdürülerek 1, 2, 5 ve 10 mM dozları larvalara uygulanmıştır. Maruziyet sonucunda kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan bazı mutasyonlar (delesyon, nokta mutasyon ve ayrılmama) fenotipe mutant kanat trikomları şeklinde yansıması ile tespit edilebilmektedir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde propamocarb hydrochloride'in sadece 10 mM'lık dozunun ikiz klon kategorisinde; kresoxim methylin 1 mM'lık dozunun küçük tek tip klonlarında ve bütün dozlarının ise ikiz klonlarında; hymexazolun 5 ve 10 mM dozlarının ikiz klonlarında; metiramın 1, 2 ve 5 mM dozlarının ikiz klonlar kategorisinde bir miktar klon artışı olduğu tespit edilmiştir, fakat oluşan bu artışların istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Diğer çalışılan dozlar ve kategorilerin istatistiksel değerlendirilmesinde ise kontrol grubuna göre negatif sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methylin *Drosophila* SMAR testi ile değerlendirilmesinde genotoksik etki bulunmamıştır ($p>0.05$).

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila melanogaster*, Hymexazol, Kresoxim methyl, Metiram, Propamocarb hydrochloride, Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN

Prof. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME FUNGICIDES by *Drosophila* SMART METHOD

Özlem SAYGIN

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Prof.Dr. Bülent KAYA

October 2019; 97 pages

Due to food needs and economic reasons, it is necessary to use pesticides to increase yield in agriculture, to fight pests and to prevent rapid deterioration of products. The pesticides can sometimes affect human health negatively due to their negative effects on non-target organisms, environmental pollution and residues on foods. In addition, as organisms can gain resistance to pesticides over time, efforts to develop new and safe pesticides are ongoing.

According to the data of Ministry of Food, Agriculture and Livestock, fungicides have been the most commonly used chemicals in our country in the last decade. Therefore, genotoxic effects of four fungicides (Metiram, Propamocarb hydrochloride, Hymexazol and Kresoxim-methyl) which are commonly used in fungus control in our country were investigated by *in vivo* wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) with the model organism *Drosophila melanogaster* in this study. In this test system, 72 ± 4 hours transheterozigot larvae were exposed to chronic exposure for 48 hours with fungicides in *Drosophila* food. In this study, transheterozigot larvae obtained by crossing *mwh/mwh* and $flr^3/TM3, Bd^s$ genetic constructs were used. All fungicides were dissolved in water and 1, 2, 5 and 10 mM doses were applied to larvae. Some mutations (deletion, point mutation and non-separation) in wing imageinal disc cells as a result of exposure can be detected from mutant wing trichomes in the phenotype.

When the results were evaluated statistically, it was found that only 10 mM dose of propamocarb hydrochloride in twin clone category; small uniform clones of 1 mM dose of kresoxim methyl and twin clones of all doses; in twin clones of 5 and 10 mM doses of hymexazole; 1, 2 and 5 mM doses of metiram in the category of twin clones were found to have some clone increase but these increases were statistically insignificant. In the statistical evaluation of other studied doses and categories, negative results were obtained compared to the control group. As a result, no genotoxic effect was found in the evaluation of metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazole and kresoxim methyl with *Drosophila* SMAR test ($p>0.05$).

KEYWORDS: *Drosophila melanogaster*, Hymexazol, Kresoxim methyl, Metiram, Propamocarb hydrochloride, Somatic mutation and recombination test (SMART)

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN

Prof. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ

ÖNSÖZ

Artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacı her geçen gün artarken verimli tarım alanları da azalmaktadır. Tarımda ekonomik nedenlerle birim alandan maksimum verimle ürün elde etmek hedeflenmektedir. Bu sırada ürünü dalında, nakliye sırasında ve depolama koşullarında koruyabilmek için pestisit kullanılması kaçınılmazdır. Kullanılan pestisitlerin hem insanlar hem de hedef olmayan organizmalar ve çevre için güvenli olması önemlidir.

Zararlı organizmaların zamanla pestisitlere karşı direnç kazanması bu alandaki diğer bir sorundur. Bu yüzden yeni ve güvenli pestisit geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Geliştirilen pestisitlerin de akut ve kronik toksisitesi, kanserojen ve mutajenik etkisi, genotoksik potansiyeli, ekotoksikolojisi, metabolizması, kalıntı süresi ve miktarıyla ilgili pek çok çalışmanın yapılması gerekmektedir. Araştırmamızla bu çalışmalara genotoksisite alanında katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Nemli iklime sahip bölgelerde bitkiler ve tarım ürünleri üzerinde fungusların üremesi ciddi zararlara yol açabilmektedir. Bu yüzden üreticiler, koruma ve tedavi amaçlı fungisit kullanmayı tercih edebilmektedirler. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın verilerine göre ülkemizde son on yılda en çok kullanılan pestisit fungisitler olmuştur. Üretimde kullanılan pestisitler tarım ürünleri üzerinde kalıntı bıraktığında, çevre kirliliğine neden olduğunda, bunların miktarı ve oluşturduğu toksik risk canlılar açısından araştırılmalıdır. Gıdalarımız üzerindeki pestisit kalıntılarının DNA'mızda hasar oluşturması ise genotoksik etkiye neden olacaktır.

Bu çalışmada Antalya yöresinde yaygın olarak yetiştirilen ürünlerde kullanılan dört fungisitin (Propamocarb hyrochloride, kresoxim methyl, hymexazol ve metiram) genotoksik etkileri ökaryotik bir organizma olan *Drosophila melanogaster*'de *in vivo* bir yöntem olan *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmıştır. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatüre katkı sağlayarak yeni çalışmalara ışık tutacağını ümit ederim.

Bu tez çalışması sırasında bana danışmanlık yapan sayın Prof. Dr. Bülent Kaya'ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Burçin Yalçın, Havva Ertuğrul ve Merve Güneş'e, çalışmada kullandığım fungisitleri hibe eden zirai ilaç firmalarına, görselleri hazırlamamda yardımcı olan sevgili babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..……i

ABSTRACT…..…….....iii

ÖNSÖZ…….……v

AKADEMİK BEYAN……..…….……..ix

SİMGELER VE KISALTMALAR……..…….…...x

ŞEKİLLER DİZİNİ…….xii

ÇİZELGELER DİZİNİ.....….…….……xv

1. GİRİŞ…… 1

2. KAYNAK TARAMASI……4

2.1. Pestisitler…… 4

2.2. Pestisitlerin Kullanım Oranları……...4

2.3. Fungisitler……...6

2.4. Gıdalarda Pestisit Kalıntısı ve Gıda Güvenliği…….. 7

2.5. Genetik Toksikoloji ve Testleri……. 8

2.5.1. Ames testi (Bakteriyel geri mutasyon testi) …… 8

2.5.2. Komet testi…….. 9

2.5.3. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)…….. 11

2.5.4. Mikronükleus testi……. 11

2.6. Çalışmada Kullanılan Fungisitler…… 12

2.6.1.Propamocarb hydrochloride……12

2.6.1.1. Propamocarb hydrochloride'in toksisitesi……..13

2.6.1.2. Propamocarb hydrochloride'in genotoksisitesi…….. 15

2.6.1.3. Propamocarb hydrochloride'in kanserojen etkisi……... 16

2.6.1.4. Propamocarb hydrochloride'in mutajenik etkisi…… 16

2.6.1.5. Propamocarb hydrochloride'in ekolojik etkileri…….16

2.6.1.6. Propamocarb hydrochloride'in bitki üzerindeki kalıntı miktarları. 17

2.6.2. Kresoxim methyl…… 18
2.6.2.1. Kresoxim methylin toksisitesi……..21
2.6.2.2. Kresoxim methylin genotoksisitesi…….....22
2.6.2.3. Kresoxim methylin kanserojen etkisi…… 22
2.6.2.4. Kresoxim methylin mutajenik etkisi……24
2.6.2.5. Kresoxim methylin ekolojik etkileri…… 24
2.6.2.6. Kresoxim methylin bitki üzerindeki kalıntı miktarları……..…...25
2.6.3. Hymexazol…… 27
2.6.3.1. Hymexazolün toksisitesi……... 28
2.6.3.2. Hymexazolün genotoksisitesi……... 28
2.6.3.3. Hymexazolün kanserojen etkisi…… 29
2.6.3.4. Hymexazolün ekolojik etkileri……..29
2.6.3.5. Hymexazolün bitki üzerindeki kalıntı miktarları…… 30
2.6.4. Metiram……...30
2.6.4.1. Metiramın toksisitesi…….31
2.6.4.2. Ethylene thiourea (ETU)……...32
2.6.4.3. Metiramın kanserojen etkisi…… 33
2.6.4.4. Metiramın ekolojik etkileri……... 33
2.6.4.5. Metiramın bitki üzerindeki kalıntı miktarları……... 33
3. MATERYAL VE METOT…… 34
3.1. Uygulanan Kimyasal Maddeler……34
3.2. *Drosophila melanogaste*r'in Yaşam Döngüsü……35
3.3. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)…… 37
3.4. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı…… 39
3.5. *Drosophila* Hatlarının Kültürü……..…….....42
3.6. Çaprazlama İçin Birey Seçimi……..... 42
3.7. Fungisitlerin Uygulanması……..…… 43
3.8. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması…….....43

3.9. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi……44
3.10. Klon İndüksiyon Frekansı ve Rekombinasyon Frekansının Hesaplanması…...47
3.11. Verilerin Değerlendirilmesi……47
4. BULGULAR…….. 49
4.1. Negatif ve Pozitif Kontrol Grupları…… 49
4.2. Propamocarb Hydrochloride…… 49
4.3. Kresoxim Methyl…… 51
4.4. Hymexazol……... 53
4.5. Metiram……....55
5. TARTIŞMA…… 58
6. SONUÇLAR…….. 70
7. KAYNAKLAR…….. 72
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Bazı Fungisitlerin Genotoksik Etkilerinin *Drosophila* SMART Yöntemi İle Araştırılması" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.



18/10/2019

Özlem SAYGIN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g : Gram

ml : Mililitre

cm : Santimetre

mM : Milimolar

^{0}C : Santigrat derece

ppm : Parts per million (Milyon başına parça)

ppb : Parts per billion (Milyar başına parça)

mg : Miligram

kg : Kilogram

µg : Mikrogram

Tezde ondalık yazımlarda nokta kullanılmıştır (“21.01”)

Kısaltmalar

ADI : Acceptable Daily Intake (Günlük Alınabilecek Maksimum Doz)

EMS : Etil metansülfonat

FAO : Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)

MRL : Maximum Residue Limits (Maksimum Kalıntı Sınırı)

SMART: Somatic Mutation and Recombination Test (Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi)

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

LOEL : Lowest Observed Effect Level (En Düşük Gözlemlenen Etki Seviyesi)

NOEL : No Observable Effect Level (Gözlemlenmeyen Etki Seviyesi)

flr^3 : Flare

mwh : Multiple wing hair

BKU : Bitki Koruma Ürünleri Veri Tabanı

PMRA : Pest Management Regulatory Agency (Kanada Haşere Yönetimi Düzenleyici Kurum)

bw : body weight (vücut ağırlığı)

ai : active ingredient

LD_{50} : Test edilen deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne yol açan doz

LC_{50} : Test edilen deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne yol açan konsantrasyon

EC_{50} : Yarı azami etkili konsantrasyon

EFSA : European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)

EPA : United States Enviromental Protection Agency (Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı)

RfD : Referans doz, ömür boyu tüketilen bir maddenin hiçbir sağlık sorunu oluşturmadığı kabul edilebilir günlük maruziyet miktarı

NOEC : No Observable Effect Concentration (Gözlenmeyen Etki Konsantrasyonu)

EC_{10} : Organizmaların %10'nunu etkileyen konsantrasyon

QoI : Quinone Outside Inhibitors (Quinone dış engelleyiciler)

ETU : Ethylene thiourea

AB : Avrupa Birliği

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

EBDC : Etilenbisditiyokarbamat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 1.Test edilen kimyasal 2. Pozitif kontrol grubu……..…..9

Şekil 2.2. Standart Komet testinde TK-6 hücreleri 5 dakika 70μM H_2O_2'ye maruz bırakıldıktan sonra elde edilen görüntü…….....10

Şekil 2.3. Mikronükleus testinde sitotoksik ve genotoksik etkilerle oluşabilecek hücre durumları……...12

Şekil 2.4. Doğal strobulinlerin elde edildiği önemli bir bazitli mantar *Strobilurus tenacellus*…….....18

Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü……..…..36

Şekil 3.2. İmajinal diskler, embriyonik primordiyaları ve ergin kütikular ürünleri……37

Şekil 3.3. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterilmesi…….....38

Şekil 3.4. *flr* örnekleri……..39

Şekil 3.5. *mwh* örneği…….....40

Şekil 3.6. Çaprazlamadaki letal etkiler ve genlerin 3.kromozom üzerindeki yerleri…….…….....41

Şekil 3.7. Serrat kanat…….…….....41

Şekil 3.8. *Drosophila* kültür şişeleri……...….42

Şekil 3.9. *Drosophila* hazır besini içeren deney tüpleri…….……..43

Şekil 3.10. Hazırlanan preparat örneği…….……44

Şekil 3.11. Kanat üzerindeki sektörler….....44

Şekil 3.12. Küçük tek tip klon…….....45

Şekil 3.13. Büyük tek tip *mwh* klon…….....45

Şekil 3.14. Büyük tek tip *flr* klon……..…..46

Şekil 3.15. İkiz klon……..…..46

Şekil 3.16. *mwh/flr*^{3} genotipindeki bireylerde görülebilecek klon tipleri ve ifade ettiği değişiklikler……..…..47

Şekil 4.1. Propamocarb hydrochloride'in klon frekans dağılımı……..…..51

Şekil 4.2. Kresoxim methyl'in klon frekans dağılımı……...53

Şekil 4.3. Hymexazol'ün klon frekans dağılımı……..…55

Şekil 4.4. Metiram'ın klon frekans dağılımı…….....57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Pestisit kullanımının avantajları ve dezavantajları……....1

Çizelge 2.1. Ülkemizde pestisit kullanım oranları…….5

Çizelge 2.2. Propamocarb hydrochloride ile ilgili kimyasal bilgiler……13

Çizelge 2.3. Yıllara göre ülkemizde Propamocarb hydrochloride tüketim oranları….14

Çizelge 2.4. Propamocarb hyrochloride ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları…..16

Çizelge 2.5. Propamocab hydrochloride için EFSA (2006) ve Türk Gıda Kodeksi (2016) MRL değerleri……...…18

Çizelge 2.6. Kresoxim methyl ile ilgili kimyasal bilgiler…….19

Çizelge 2.7. Yıllara göre ülkemizde kresoxim methyl tüketim oranları……...…19

Çizelge 2.8. Kresoxim methyl aktivite spektrumu ……..20

Çizelge 2.9. Kresoxim methyl ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları…….22

Çizelge 2.10. EFSA (2014) tarafından Avrupa Birliği ülkeleri için ve Türk Gıda Kodeksi (2016) tarafından Türkiye için tanımlanan tarım ürünleri üzerinde bulanabilecek kresoxim methyl MRL değerleri..……...…26

Çizelge 2.11. Hymexazol ile ilgili kimyasal bilgiler…….27

Çizelge 2.12. Yıllara göre ülkemizde hymexazol tüketim oranları……..28

Çizelge 2.13. Hymexazol için Türk Gıda Kodeksi MRL değerleri……..30

Çizelge 2.14. Metiram ile ilgili kimyasal bilgiler…….31

Çizelge 2.15. Yıllara göre ülkemizde metiram tüketim oranları……..31

Çizelge 2.16. ETU ile ilgili kimyasal bilgiler……...32

Çizelge 3.1. Çalışmada genotoksik etkisi araştırılan fungisitlerle ilgili bilgiler…...…34

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmessi……...…48

Çizelge 4.1. Propamocarb hydrochloride'in *Drosophila melanogaster*'in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri……...50

Çizelge 4.2. Kresoxim methyl'in *Drosophila melanogaster*'in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri……...52

Çizelge 4.3. Hymexazol'un *Drosophila melanogaster*'in normalkanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri……54

Çizelge 4.4. Metiram'ın *Drosophila melanogaster*'in normalkanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri……56

1. GİRİŞ

Tarımda birim alandan daha fazla ürün alabilmek, ürün kayıplarını önlemek ve bitki gelişimi için bitki koruma ürünleri kullanılmaktadır. Gıda ihtiyacı ve ekonomik sebeplerle, tarımda verimi artırmak, zararlılarla mücadele etmek ve ürünlerin çabuk bozulmalarını önlemek için pestisit kullanmak gerekmektedir.

Herhangi bir zararlıyı kovmak, tahrip etmek veya kontrol etmek amacıyla ya da bitki gelişimini düzenlemek için kullanılan kimyasal ya da biyolojik madde veya madde karışımlarına pestisit denir (FAO 2013b). İnsanlar tarım toplumuna geçiş yaptıktan sonra bazı maddeleri pestisit olarak kullanabileceklerini keşfetmişlerdir. M.Ö. 1200 yılında bazı tuzların ve küllerin pestisit olarak kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 1000'de kükürtün insektisit ve fungisit etkisi keşfedilmiştir. İnsektisitler arasında ilk organofosfat (TEPP) 1938 yılında, ilk organoklorin (DDT) 1939 yılında, ilk carbamatlar (Isolan, Dimeton, Pyramat ve Pyrolan) 1951 yılında ve ilk sentetik pyrethroid (Allenthrein) 1949 yılında kullanıma sunulmuştur. İlk herbisit (Amonyum sülfamat) ve ilk carbamat herbisit (Propham) 1945'te kullanılmaya başlanmıştır. İlk mikrobiyal insektisit (*Bacillus thuringiensis*) 1938'de kullanılmıştır. İlk dikarboksimid fungisiti olan Captan 1949'da piyasaya sürülmüştür. 1943'te ilk dithiocarbamate fungisitin (Zineb) bitki koruma amacıyla kullanılması tavsiye edilmiştir. 1961'de Mancozeb fungisiti ortaya çıkmıştır (Ağar vd. 1991).

Pestisit kullanmanın avantajlarını ve dezavantajlarını Çizelge 1.1'deki gibi listeleyebiliriz.

Çizelge 1.1. Pestisit kullanımının avantajları ve dezavantajları

Avantajları	**Dezavantajları**
• Etkili bir yöntem • Hızlı sonuç verir. • Ekonomik kazanç sağlar. • Ürünü toksin sağlayan organizmalardan tarla ortamında koruyabilir. • Bitki gelişimini istenilen yönde etkileyebilir. • Kaliteli ve verimli ürün eldesi sağlar.	• Hedef olmayan organizmalar da pestisite maruz kalır. • Mutajenik ve kanserojenik etkiler • Sağlık üzerinde olumsuz etkiler • Gıdalar üzerinde pestisit kalıntıları bulunması • Bitki üzerinde mutajenik etkiler • Çevre kirliliği • Organizmaların pestisitlere karşı direnç kazanması • Genotoksik etkiye sahip olabilirler.

Pestisitler hedef organizmaya göre herbisit, insektisit, fungisit, akarisit, rodentisit, mollusit, nematisit, afisit, avisit ve bakterisit gibi farklı isimler alırlar.

Tarım ürünlerinde meydana gelen mantar hastalıklarının tedavisinde, mantarları ve sporlarını öldürmek amacıyla fungisit denilen tarım ilaçları kullanılır. Fungisitler etki yeri özelleşmemiş yani çok yer engelleyici fungisitler ve etki yeri özelleşmiş yani tek yer engelleyici fungisitler olarak ikiye ayrılır. Etki yeri özelleşmemiş fungisitler içerisinde elementer kükürt, bakırlı fungisitler, dithiokarbamatlar gibi klasik fungisitler bulunmaktadır. 1960'lı yıllarda piyasaya çıkmışlardır. Mikroorganizmalarda birden fazla metabolik olayı engelledikleri tespit edilmiştir. Fungitoksik etkilerinin ana nedeni temel cystein yapılarının bloke edilmesidir. Bu gruptaki fungisitlerin etki yeri özelleşmemiş olduğu için bitki kütikulasını geçtiklerinde fitotoksik de olabilmektedirler. Fakat fungusların bu gruptaki fungisitlere direnç kazanma oranı çok düşüktür (Delen 2006). Çalışmamızda seçtiğimiz fungisitlerden biri olan metiram da dithiocarbamate grubundan klasik bir fungisittir.

1960'lı yılların sonlarından itibaren piyasaya çıkmaya başlayan etki yeri özelleşmiş fungisitlere modern fungisitler de denir. Bitkilere penetre edebilmekte, sistemik veya translaminar özellik göstermektedirler. Bu sınıfın yeni üyelerinden olan Quinone dış engelleyicileri (QoI) grubundan strobilurinler mesostemik özellik gösterirler. Mesostomik, bitki yüzeyi ile fungisit arasında yüksek afinitenin bulunması ve fungisitin bitki kütikulası tarafından emilmesidir. Etki yeri özelleşmiş fungisitler, hedef hücrede tek etki yerine sahiptir. Fungusların bu gruptaki fungisitlere direnç kazanma riskleri düşük, orta veya yüksek olabilmektedir. Etki yeri özelleşmiş fungisitlerin gün geçtikçe daha çok kullanılmaları ve piyasaya çıkan yeni fungisitlerin bu sınıfın türevleri olmasının en önemli nedeni klasik fungisitlere oranla patojenlere daha düşük dozlarda daha yüksek etki göstermeleridir (Delen 2006). Çalışmamızda genotoksik etkisini araştırmak amacıyla seçtiğimiz fungisitlerden üç tanesi etki yeri özelleşmiş yeni nesil fungisitlerdendir. Propamocarb hydrochloride, carbamate sınıfındandır. Kresoxim methyl, QoI grubundan strobilurin ailesinin bir üyesidir. Hymexazol ise isoxazole grubu bir fungisittir.

Antalya'da sera sebze üretiminde pestisit kullanımının ekonomik açıdan değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada üreticilerle anket çalışması yapılmıştır. Üreticilerin genel olarak fungisitleri önerilen dozdan daha fazla kullandığı tespit edilmiştir. Etken maddesi Dithiokarbamatlar (mancozeb) olan ilaçlar önerilen dozdan 2.5 kat, Benzimidazollaer (Benomyl) 1.5 kat, oxadıxyl+mancozeb 4.5. kat, metalaxyl+mancozeb 3.4 kat fazla kullanıldığı ifade edilmiştir (Özkan vd. 2002). Fungisitlerin önerilen dozdan fazla kullanılması, fungusların direnç kazanmalarına, bitki üzerinde kalıntı miktarının fazla olmasına ve çevre kirliliğine sebep olabilir.

Gıda güvenliği, "sağlıklı ve kusursuz gıda üretimini sağlamak amacıyla gıdaların; üretim, işleme, muhafaza ve dağıtımları sırasında gerekli kurallara uyulması ve önlemlerin alınmasıdır.". İlk kez 1948 yılında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntıları bulunmuştur. 1960 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) pestisit kalıntıları ile ilgili Günlük Alınabilecek Maksimum Doz

(Acceptable Daily Intake=ADI) ve gıdalarda bulunabilecek Maksimum Kalıntı Sınırı (Maximum Residue Limits=MRL) olmak üzere iki güvenlik değeri belirlemiştir. Ömür boyunca insan sağlığına olumsuz etki yapmadan gıdalarla birlikte günlük alınabilecek madde miktarına ADI değeri denir. İnsan ve hayvan yiyeceği olarak kullanılan gıdalar üzerinde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarına MRL değeri denir (Altıkat vd. 2009; Canik vd. 2012). İhraç edilmekte olan gıdalardan bazıları, üzerinde bulunan pestisit kalıntı miktarlarının yüksek olmasından dolayı ülkeye geri gönderilmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde fungus kontrolünde yaygın olarak kullanılan dört fungisitin (metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl) genotoksik etkilerinin model organizma *Drosophila melanogaster* ile yapılan *in vivo* kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1.Pestisitler

Pestisit; bitki büyümesini düzenleme ve tarım zararlılarını kontrol etme, uzaklaştırma veya yok etme amacıyla kullanılan kimyasal veya biyolojik madde ya da madde karışımlarıdır (FAO 2014). Bilinen en eski pestisit Mezopotamya'da Sümerliler tarafından kullanılan elemental kükürt tozudur (Altıkat vd. 2009).

Tarım ürünlerinde hastalıklarla mücadelede ve ürün kayıplarını önlemede pestisit kullanımı hem azaltılmak istenmekte hem de daha güvenli pestisitler bulmak için araştırmalar yapılmaktadır. Pestisitlerin çevre kirliliğine neden olması ve hedef olmayan organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, düşük dozlarda etkili ve toksisitesi az olan modern pestisitler kullanılmaya başlanmıştır. EPA; riski düşük, çevreyle dost pestisitlerde şu özelliklerin bulunması gerektiğini açıklamıştır:

- ✓ İnsan sağlığına etkisi az,
- ✓ hedef dışı organizmaları zehirleme oranı düşük,
- ✓ uygulama dozu düşük,
- ✓ zararlılarda dayanıklılık riski az,
- ✓ yer altı sularını kirletme ihtimali az,
- ✓ entregre zararlı yönetimine (Integrated Pest Management, IPM) uygun olması (Delen, 2016).

2.2. Pestisitlerin Kullanım Oranları

II. Dünya savaşından sonra gelişen sanayi ve teknoloji ile tarımsal üretimde artış olduğu, bunun yanında tarım ürünlerini korumak için pestisit kullanımının da tüm dünyada bir artış gösterdiği gözlenmiştir (Arslan ve Çiçekgil 2018). Zaman içerisinde pestisit kullanımının yararlarının yanı sıra ekosisteme ve insan sağlığına zarar verdiği fark edilmiştir. İlk kez 1948 yılında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntıları bulunmasıyla pestisit kalıntılarının verebileceği zararlar anlaşılmıştır. 1960 yılında ise FAO ve WHO tarafından "pestisit kalıntıları kodeks komitesi" kurularak her pestisit çeşidi için tarım ürünleri üzerinde bulunabilecek MRL değerleri belirlenmiştir (Altıkat vd. 2009).

FAO 2015 yılı verilerine göre, dünyada birim alanda kullanılan tarım ilacı miktarı hektarda 4,91 kg iken Avrupa Birliği (AB)'nde ise ortalama 2.69 kg'dır. AB'de en fazla pestisit kullanan ülkeler sırasıyla Hollanda (9.34 kg/ha), İtalya (6.96 kg/ha), Almanya (4.03 kg/ha) ve İngiltere'dir (3.02 kg/ha). Türkiye'de ise aynı yılın verilerine göre pestisit kullanım oranı Avrupa Birliği ortalamasından daha az, yaklaşık 1.63 kg/ha olarak verilmiştir (Arslan ve Çiçekgil 2018).

Ülkemizdeki kullanılan yıllık pestisit oranı 2017 yılında 54 098 tonu bulmuştur. Son yıllarda toplam tüketim oranının en az olduğu yıl 37 651 ton ile 2009 yılıdır. Kullanılan pestisit çeşitlerine baktığımızda en çok fungisit kullanıldığı, daha sonra ise insektisit ve herbisit kullanıldığı görülmektedir. 2016-2017 yıllarında fungisit kullanım oranı % 40, insektisit ve herbisit kullanım oranları ise % 21'dir (TÜİK 2019) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Ülkemizde pestisit kullanım oranları (TÜİK 2019)

(**Ton**)

	İnsektisitler	**Fungisitler**	**Herbisitler**	**Akarisitler**	**Rodentisitler**	**Diğer**	**Toplam**
2006	7 628	19 900	6 956	902	3	9 987	45 376
2007	21 046	16 707	6 669	966	51	3 277	48 716
2008	9 251	16 707	6 177	737	351	5 613	38 836
2009	9 914	17 863	5 961	1 533	78	2 302	37 651
2010	7 176	17 396	7 452	1 040	147	5 344	38 555
2011	6 120	17 546	7 407	1 062	421	6 978	39 534
2012	7 264	18 124	7 351	859	247	8 766	42 611
2013	7 741	16 248	7 336	858	129	7 128	39 440
2014	7 586	16 674	7 794	1 513	149	6 007	39 723
2015	8 117	15 984	7 825	1 576	197	5 327	39 026
2016	10 425	20 485	10 025	2 025	259	6 835	50 054
2017	11 436	22 006	11 759	2 452	236	6 209	54 098

Kaynak: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Tablodaki rakamlar, yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

2.3. Fungisitler

Tarım ürünlerinde meydana gelen mantar hastalıklarının tedavisinde, mantarları ve sporlarını öldürmek amacıyla fungisit denilen tarım ilaçları kullanılır. Mantarlar, insanoğlu tarıma başladığından bu yana mahsul verimi için insanlarla rekabet etmektedir. Lime sülfür ve Bordeaux karışımının mantar öldürücü etkilerinin keşfedilmesi, 100 yıl önce modern fungisit gelişiminin öncülü olmuştur (Ypema ve Gold, 1999).

En eski mantar öldürücüler kükürt, kireç, bakır ve civa gibi inorganik elementlerdir. Element sülfür, organik tarımda da kullanılabildiği için entegre haşere yönetim sistemlerinin önemli bir bileşeni olarak ifade edilmiştir. Fakat yüksek dozda sülfüre maruz kalmak insanlarda dermatit vakalarının artmasına ve ruminantlarda hastalıklara sebep olmuştur. Civa içeren fungisitler birçok ölümden veya kalıcı nörolojik sakatlıktan sorumlu olmuştur. Daha önceki inorganik metalik fungisitlerin bazıları, birçok ülkede toksisiteleri ve olumsuz çevresel etkileri nedeniyle geri çekilmiştir. Bir başka bileşik olan hexachlorobenzen (HCB), 1940'lardan 1950'lere kadar, kuru toz halinde tohum tanelerine örtü şeklinde uygulanan yaygın kullanılmış bir fungisittir. 1955 ve 1959 yılları arasında Türkiye'de epidemik zehirlenmeler meydana gelmiş, kara boğaz denilen ve 4000'den fazla ölümle sonuçlanan bir sendromla sonuçlanmıştır. Çok toksik bir bileşiktir ve aşırı duyarlılığı içeren ciddi cilt belirtilerine yol açabilmektedir. O zamandan beri, bitkilerde, tohumlarda ve ürünlerde mantar hastalıklarını kontrol etmek için birçok bileşik geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Etilenbisditiyokarbamatlar (EBDC'ler) da dahil olmak üzere karbamik asit türevleri, 1940'lardan bu yana dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir fungisit grubudur. Bu sınıfın önemli üyeleri mancozeb, maneb, metiram, zineb ve nabamdır. Tüm üyeler, ayrı ayrı bileşiklerle bağlantılı farklı metallerle bir EBDC omurgasına sahiptir. Captan, folpet ve captafol 55 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır. Halojenli bir benzonitril fungisiti olan klorothalonil, ilk kez 1966'da Amerika Birleşik Devletleri'nde bir tarım kimyasalı olarak kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Klorothalonil ayrıca, boyalarda ve yağlayıcı sıvılarda kullanımı da dahil olmak üzere daha geniş biyosidal uygulamalara sahiptir. Benzimidazol fungisitler, benomil ve karbendazim, 40 yıldan fazla bir süredir kullanılmakta iken, yeni bir fungisit sınıfı (siprodinil, mepanipirim ve pirimetanil) olan anilinopirimidinler, 1993'te (Fransa'da Ciba tarafından cyprodinil) uygulamaya konmuştur (Gupta ve Aggarwal 2012).

Fungisitler tarımda, sanayide, ev ve bahçelerde yaygın olarak şu amaçlar için kullanılmaktadır:

1. Tohumluk tahılların depolanması, nakliyesi ve çimlenmesi sırasında korunması,
2. Tarlada, depoda ve nakliyede olgun mahsullerin, meyvelerin, fidelerin, çiçeklerin ve otların korunması,
3. Boyalı yüzeylere saldıran küflerin baskılanması,
4. Kağıt hamurlarında balçık kontrolü,
5. Evde halı ve kumaşların korunması (Gupta ve Aggarwal 2012).

Tarım zararlıları zamanla kullanılan pestisitlere karşı direnç kazanabilmekte ve hedef tür üzerinde hiçbir etkisi olmayabilmektedir. Strobilurinler ve diğer yeni aktif bileşenler, fungisit direncinin gelişiminin yönetilmesinde giderek daha önemli roller oynamaktadır. Birçok mantar, birçok fungisitin mantar metabolizmasının tek bölge inhibitörleri olması nedeniyle onları kontrol eden fungisitlere karşı direnç geliştirmiştir. Geçmiş yıllarda bu durum, ekonomik açıdan önemli patojenler olan elmada hastalık yapan *Venturia inaequalis*'de ve üzüm tozlu küfüne neden olan *Uncinula necator*'de demetilasyon inhibitörleri (DMI fungisitleri) sınıfının üyeleri için onaylanmıştır. Bu nedenle, bir hastalık yönetim programı uygulandığında fungisit direnci olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır (Ypema, 1999).

2.4. Gıdalarda Pestisit Kalıntısı ve Gıda Güveliği

Pestisitlerin yanlış ve fazla kullanımı, uygulama ile hasat arasındaki sürenin kısa olması gıdalar üzerinde pestisit kalıntıları olmasına neden olmaktadır. Gıdalarla insanlara taşınan pestisitler farklı sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Gıda güvenliği; gıdaların üretimi, taşınması, depolanması, dağıtımı ve tüketimi aşamalarında gerekli sağlık kurallarına uyulması ve önlemlerin alınmasıdır (Erkmen 2010). Pek çok çalışma pestisit maruziyeti ile artmış kanser riski, nörodejeneratif ve nörogelişimsel bozukluklar, solunum yolu hastalıkları ve diyabet arasındaki ilişkileri göstermiştir. Pestisitlerin genotoksisitesinin değerlendirilmesi ve maruz kalan popülasyonlardaki etkilerinin biyolojik olarak izlenmesi, daha iyi bir düzenleme ve koruma için kritik öneme sahiptir, ancak pestisitler genellikle kompleks karışımlar olarak kullanıldığı için bu durum zor olabilmektedir (Bolognesi ve Holland 2016).

2013 yılında EFSA'ya farklı ülkelerden pestisit kalıntı analizi sonuçları bildirilmiştir. Toplam 685 pestisit için 80 967 örnek analiz edilmiştir. Numunelerin çoğunluğu (55 253 numune, %68.2) AB ve Avrupa Ekonomik Bölgesi (AEA) ülkelerinden; 22 400 örnek (%27.7) üçüncü dünya ülkelerinden ithal edilen ürünlerden oluşmuştur. 3 314 örnek için ise (%4.1) ürünlerin menşei rapor edilmemiştir. Genel olarak, analiz edilen örneklerin %97.4'ü yasal sınırlar içinde kalmıştır. Test edilen numunelerin %54.6'sı tespit edilebilir kalıntı içermezken, %42.8'inin izin verilen kalıntı konsantrasyonlarını aşmayan ölçüde kalıntı içerdiği bildirilmiştir. Tüm örneklerin %2.6'sının MRL değerlerini aşan (22 116 örnek) miktarda kalıntı içerdiği belirlenmiştir. Bu örneklerin (22 126 örnek) % 27.3'ünde birden fazla pestisit kalıntısı bulunmuştur. Toplamda 597 bebek maması örneği analiz edilmiştir. Numunelerin %92.7'sinde tespit edilebilir bir kalıntı bulunmazken, 116 örnekte (%7.3) kalıntılar miktar sınırının üzerinde bulunmuştur. Rapor eden ülkeler 11 örnek için (analiz edilen bebek maması örneklerinin %0.7'si) kalıntı miktarının MRL'yi aştığını belirtmiştir. Hayvansal ürün örneklerinin çoğunluğunun (8 257 örnek) ölçülebilir kalıntı içermediği belirtilmiştir (%88.7 265 örnek). En sık tespit edilen pestisitlerin, kalıcı çevresel kirleticiler veya pestisit kullanımı dışındaki kaynaklardan gelen bileşikler olduğu ifade edilmiştir (EFSA 2015b).

Ülkemizde Antalya, Mersin ve Adana illerinde satışa sunulan yeşil biber ve salatalık üzerindeki 170 farklı pestisitin kalıntı miktarının araştırıldığı çalışmada 725 örnek tandem bağlanmış sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile

incelenmiştir. Propamocarb %8.8 oranıyla salatalıklarda en yaygın bulunan pestisit kalıntısı olmuştur. Kalıntı miktarları 0.017-0.436 mg kg^{-1} arasında değişmektedir (Golge vd. 2018). EFSA (2006) tarafından belirtilen ADI=0.29 mg/kg bw/gün olduğuna göre kalıntı miktarının bazı örneklerde bu değeri aştığı görülmektedir. Kalıntı miktarları, Türkiye'de hıyar için belirlenen MRL değerini (5 mg/kg) ise aşmamaktadır.

2002-2010 yılları arasında yapılan iki Brezilya izleme programına göre, dithiokarbamat gıdalarda en çok tespit edilen pestisit olmuştur. Analiz edilen 13 556 örneğin %20'sinde bu pestisit bulunmuştur. Dithiokarbamatın toksikolojik endişesi esas olarak tiroid kanserine sebep olma potansiyeli ile ilgili olmuştur (Jardim vd. 2018).

Pestisit kalıntılarından dolayı toprak kirliliği, hedef olmayan türlere toksik etkileri ve toprakta yüksek kalıcılığı olan bazı pestisitlerden dolayı artan endişe konusu haline gelmiştir. Bir araştırmada, AB'den 317 tarımsal toprak örneğinde 76 pestisit kalıntısı değerlendirilmiştir. Test edilen toprakların %80'den fazlasında pestisit kalıntısı bulunmuştur. Örneklerin %25'inin bir çeşit pestisit kalıntısı, %58'inin iki veya daha fazla çeşit pestisit kalıntısı içerdiği tespit edilmiştir. Gliofosfat ve metaboliti AMPA, DDT ve metabolitleri, geniş spektrumlu fungisit olan boscalid, epoxiconazole ve tebuconazole toprak örneklerinde en sık ve en yüksek konsantrasyonlarda bulunan bileşikler olmuştur (Silva vd. 2019).

Polonya'da tandem kütle spektrometresi ile birleştirilmiş sıvı ve gaz kromatografisi kullanılarak değiştirilmiş QuEChERS yöntemi ile 155 bal örneğinde 207 pestisit kalıntısı araştırılmıştır. Balda 21 pestisit kalıntısı tespit edilmiştir. Neonikotinoidler (acetamiprid, thiacloprid) örneklerin %77'sinde ölçülmüş ve en sık rastlanan pestisitler olmuştur. Acetamiprid konsantrasyonu 0.001-0.13 mg/kg iken thiacloprid konsantrasyonu 0.001-0.2 mg/kg olarak bulunmuştur. Örneklerin %50'sinde fungisit, %35'inde amitraz metabolitleri tespit edilmiştir. İncelenen örneklerde hymexazol, propamocarb ve kresoxim methyl kalıntısı da araştırılmış fakat tespit edilmemiştir (Gawel vd. 2019).

2.5. Genetik Toksikoloji ve Testleri

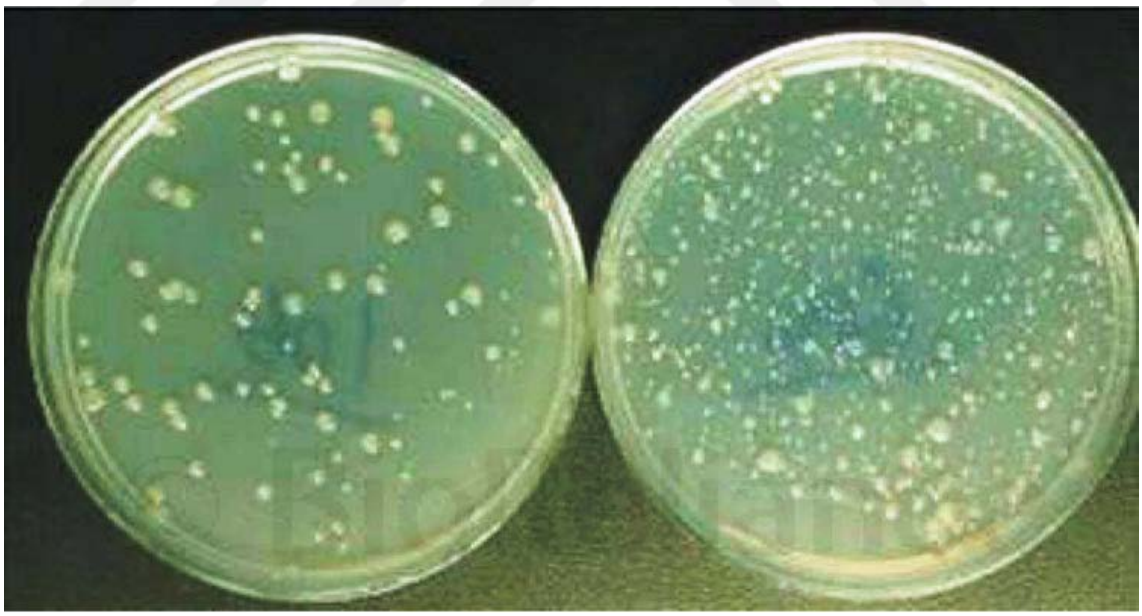
Genetik toksikoloji, toksik maddelerin DNA ve kromozomlarda meydana getirdiği hataları inceleyen bilim dalıdır. Bu hatalar gen mutasyonları, DNA kırıkları, kromozom anormallikleri ve DNA eklentileri olabilir. Bu tip genetik hasarlar kansere, yaşlanmaya, doğum defektlerine, infertiliteye ve bazı genetik hastalıklara yol açabilir. Kimyasal ve fiziksel maddelerin mutajenitelerinin ve karsinojenik etkilerinin belirlenmesi için çeşitli genotoksikoloji testleri kullanılmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011a). Bu sayede insan ve çevre sağlığı için bu maddelerin kullanım oranı ve şekli belirlenmektedir. Aşağıdaki bazı genotoksikoloji testleriyle ilgili bilgiler verilmiştir.

2.5.1. Ames testi (Bakteriyel geri mutasyon testi)

Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi, hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilen bakteriyel bir testtir. Bu test, somatik hücrelerde tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen nokta mutasyonlarının saptanmasında,

antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tespitinde sıklıkla kullanılır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011a).

Ters mutasyon testi olan bu test, histidin operonundaki çeşitli genlerdeki mutasyonlara sahip histidin bağımlı *Salmonella* suşlarını kullanan ve onların histidin aminoasitini sentezleyememelerini sağlayan bir testtir. Suşlar, histidinin sentezlenmesi ve ana suşun gerektirdiği aminoasitin yokluğunda büyümek için fonksiyonel yeteneklerini geri kazanır. Bu olay düşük frekansla gerçekleşir. *Salmonella* test suşları, bir histidin izi içeren agar plakası üzerinde minimal bir ortamda büyütüldüğünde, sadece koloniler oluşturur. Plaka başına kendiliğinden indüklenen revertant (mutant formdan normal forma dönen) kolonilerin sayısı nispeten sabittir. Bununla birlikte, plakaya bir mutajen eklendiğinde, genellikle doza bağlı bir şekilde, normale geri dönen kolonilerin sayısı artar. Şekil 2.1'de bir deney ve bir pozitif kontrol grubu petri resimleri verilmiştir. Ames testi, gen mutasyonlarına neden olan bileşikleri veya karışımları tanımlamada birçok avantaja sahiptir. Örneğin; bakterileri kısa bir sürede çoğaltma ve sonuçlar elde etmeyi sağlar, çok sayıda test malzemesini ucuza çalışmayı ve test edilen materyallerin moleküler mekanizma etkisini tanımlamayı sağlar. Ayrıca, *Salmonella* prokaryotik bir organizma olmasına rağmen, Ames test sisteminin sitokromda bulunan P450 metabolik oksidasyon sistemi ile kombinasyonu, aktif formlara metabolize edilmedikçe biyolojik olarak aktif olmayan bazı mutajen ajanların belirlenmesine olanak sağlar. Ames testi, çevre örneklerini, kişisel maruz kalma ve metabolizma ile ilişkili ajanları değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Kullanımı 1980'lerde zirveye ulaşmıştır, ancak hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Farmasötik endüstrisi de binlerce maddeyi bakteriyel ters mutasyon tahlilinde test etmiştir (Sierra ve Gaivao 2014).

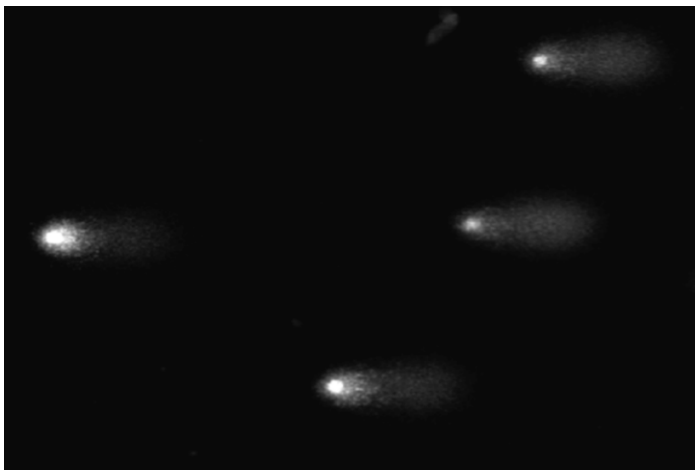


Şekil 2.1. 1. Test edilen kimyasal 2. Pozitif kontrol grubu (Parry ve Parry 2012)

2.5.2. Komet testi

Alkali komet testi (tek hücreli jel elektroforezi), DNA kırılmalarını tespit eden hassas ve çok yönlü bir genotoksisite testidir. Hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere

veya nükleer süspansiyonlara çok benzer protokollerle uygulanabilir. Kültürdeki hücrelere, birincil hayvan ve insan hücrelerine (örneğin; kan hücreleri, farklı dokulardan hücreler ve sperm hücreleri), yumuşakçaların ve böceklerin hemolenf hücrelerine, mayalara ve bitki dokularının çekirdeklerine uygulanmıştır. Ayrıca izole kromozomlara başarıyla uygulanmıştır. Hem temel hem de uygulamalı araştırmalarda, genotoksisite testlerinde, biyomonitörleme ve ekogenotoksikolojide yaygın olarak kullanılır. Komet testi bir hücrede, bir dereceye kadar normal hücrenin tamir etme kabiliyeti dahilinde olan birkaç yüz ila birkaç bin DNA kırılmasını tespit eder. DNA'sı zarar gören her bir hücre kuyruklu yıldız benzeri bir uzantı verir ve bu uzantı DNA hasarı ölçüsünü gösterir (Şekil 2.2). Bir numunedeki tüm kometlerin sonuçlarının, kuyruktaki DNA yüzdesi için ortalama veya ortanca değer üretmek için bir araya getirilmesi gerekir. İyonlaştırıcı radyasyonun bilinen iplik koparma etkilerine karşı kalibrasyon yapılabildiğinden, komet testi nicel bir yöntem olarak kabul edilebilir. Zaman içerisinde, testin birçok farklı versiyonu tarif edilmiştir. En önemlilerinden biri, spesifik DNA lezyonlarını saptamak için spesifik enzimlerin dahil edilmesidir. Protokol, parçalanmış hücrelerin bir bakteri DNA tamir enzimi olan endonükleaz III (Endo III) ile inkübasyonunu içermektedir. Enzim, okside olmuş pirimidinleri uzaklaştırır ve sonuçta ortaya çıkan AP bölgesinde bir kırılmaya neden olur. Kırılma, standart protokolün geri kalanında yani alkalin çözülme ve elektroforezde belirlenir. Bunun dışında farklı enzimler komet testi ile birlikte başarıyla kullanılmıştır: bakteriyel formamidopirimidin DNA glikosilaz (FPG), alkillenmiş veya oksidize pürinlerin parçalanmasından kaynaklanan oksitli pürinleri, çoğunlukla 8-oksoGua ve formamidopirimidinleri (FaPy bazları) ortaya çıkarmak için; T4 endonükleaz V (T4endoV), siklobutan pirimidin dimerlerini saptamak için; bakteriyel AlkA, 3-metiladenin kalıntılarını tespit etmek için; bakteriyel urasil DNA glikosilazı, yanlış birleşmiş urasili saptamak için; insan OGG1, memeli benzeri bakteriyel FPG, 8-oxoGua'yı tespit etmek için kullanılır. Komet testinin enzimlerle birleştirilmesi, yeni kozmetiklerin, ilaçların ve kimyasalların *in vitro* taranması için yalnızca kırılmaları değil, genotoksisite testlerinde yıllarca kullanılan spesifik lezyonları saptama fırsatı verir. Duyarlılığı, diğer genotoksisite analizlerine (yani, mikronükleus, kardeş kromatit değişimi ve kromozom sapma analizleri) benzerdir. Aynı zamanda, mikronükleus analizinde şüpheli veya negatif sonuçlar veren, bilinen 67 kanserojen ile iyi duyarlılık ve özgüllük göstermiştir (Sierra ve Gaivao 2014).



Şekil 2.2. Standart Komet testinde TK-6 hücreleri 5 dakika 70µM H_2O_2'ye maruz bırakıldıktan sonra elde edilen görüntü (Sierra ve Gaivao 2014)

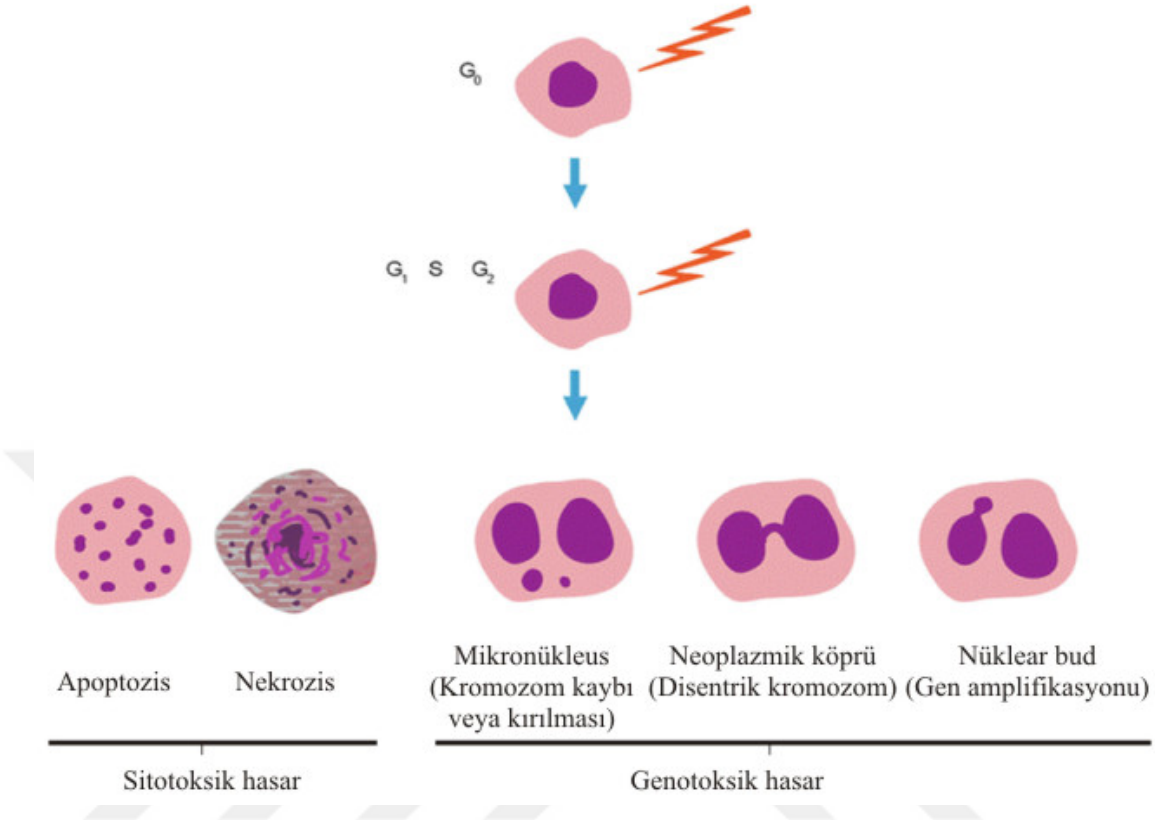
2.5.3. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

SMART, *Drosophila melanogaster* için tasarlanan ve yapılan *in vivo* genotoksisite testidir. Yetişkin dokularında fenotipik olarak gözlemlenen genetik markerler kullanılarak, deneyler heterozigot veya transheterozigot bireylerde seçilen genetik markerler için heterozigotluk kaybını tespit eder. Her ne kadar bu heterozigozite kaybı teorik olarak nokta mutasyonları/kayıpları, bağlantısızlık ve homolog mitotik rekombinasyon gibi farklı olaylardan kaynaklansa da, bağlantısızlık işlemleri genellikle test edilen kimyasalların çoğu için geçerli değildir. Aynı genetik temelde, iki farklı yetişkin dokusunu hedef alan, iki farklı SMART analizi vardır: Kanat noktası testi ve göz noktası testi. Her iki testte, somatik hücrelerde mutasyon ve rekombinasyonun tespiti, yetişkin dokularda fenotipik olarak mutant noktalar aranması ve skorlanması yoluyla gerçekleştirilir. Esas olarak gen mutasyonunun ve homolog rekombinasyonunun indüksiyonunu tespit ettikleri için, yüksek ökaryotik organizmaların somatik hücrelerinde kimyasalların potansiyel genotoksisitesini *in vivo* analiz etmek için çok faydalı testlerdir. Somatik hücrelerde mitotik rekombinasyonun nicelendirilmesinin, genotoksisite taraması ile ilgili olduğu, çünkü anormal rekombinasyon aktivitesinin, genellikle karsinojenez ile ilişkili olduğu belirtilmelidir. Bu testler radyasyon, metaller, kimyasallar, bitki özleri/ürünleri, tedavi ilaçları, gıda ürünleri, böcek ilaçları, farklı tür kirleticiler ve nanopartiküller gibi farklı tip ajanların genotoksisitesinin analizinde kullanılmıştır. Bunlar ayrıca olası antimutajenlerin analizinde de kullanılmıştır. Kanat nokta testi, nokta mutasyonu, nükleotit kaybı, ayrılmama veya mitotik rekombinasyona bağlı olarak oluşan heterozigotluk kaybını yansıtan mutant klonların indüksiyonunun kontrolünde, 3. kromozom üzerinde lokalize olan resesif çoklu kanat kılları (*mwh*) ve alev benzeri kanat kılları (*flr)* genetik markerlarını kullanır. Göz *w/w* + SMART testi, yabani tip gözler üzerinde resesif marker olan X-kromozomu *white (w)* genini kullanır. Beyaz klonların varlığı, *White* lokusta nokta mutasyonları ve/veya nükleotit kayıpları, ayrılmama ve homolog mitotik rekombinasyon ile *Drosophila*'nın *in vivo* somatik *w/w+* hücrelerinde heterozigot kaybının meydana geldiğini gösterir. Vogel ve Nivard (2000), tarafından bu analizin geç larva aşamalarında indüklenen kromozomal anormalliklerinin tespitine izin veren daha ayrıntılı bir versiyonu geliştirilmiştir. Bu test, mitotik homolog rekombinasyonun nicelendirilmesine izin verir, çünkü hemizigot hücrelerde *w+* markerının kaybı erkeklerde beyaz klonlara yol açar. Bu durumda, beyaz klonlar *white* lokustaki intrakromozomal rekombinasyon ve/veya nokta mutasyonları ve nükleotit kayıpları sonucu oluşmuş olabilir (Sierra ve Gaivao 2014).

2.5.4. Mikronükleus testi

Uygulanan maddenin etkisiyle hücrenin mitoz bölünmesi sırasında tam kromozomların veya asentrik kromozom parçalarından oluşan mikronükleus içeren hücrelerin frekansına dayalı bir testtir. Bu oluşumlar kromozom hasarlarından, genlerdeki eksikliklerden, kinetokor ve iğ ipliklerindeki hatalardan meydana gelir. Hücre kültürlerine Cyt-B eklenmesiyle çekirdek bölünmesini tamamlamış, sitokinezi gerçekleşmemiş çift çekirdekli hücrelerde mikronükleus bulunduran hücreler sayılır. Her bir preparatta 2000 binükleat içeren hücreye bakılır, mikronükleus içeren hücreler ve içerdikleri mikronükleus sayıları belirlenir, buna bağlı hesaplamalar yapılır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011b). Şekil 2.3'de mikronükleus testinde sitotoksik ve genotoksik etkilerle meydana gelebilecek hücre tipleri verilmiştir. Apoptozis ve

nekrozis sitotoksik hasarı; mikronükleus, neoplazmik köprü ve nükleer bud genotoksik hasarı göstermektedir (Sierra ve Gaivo 2014).



Şekil 2.3. Mikronükleus testinde sitotoksik ve genotoksik etkilerle oluşabilecek hücre durumları (Sierra ve Gaivo 2014)

2.6. Çalışmada Kullanılan Fungisitler

2.6.1. Propamocarb hydrochloride

Propamocarb hydrochloride, karbamat sınıfı fungisitlerdendir. Etkili olduğu funguslar Oomycotina üyeleriyle sınırlıdır. Yapraklardan veya köklerden alınır, özellikle phycomycetous hastalıklarını kontrol etmede koruyucu etkisiyle birlikte çok bölgeli bir inhibitör olarak etki gösterir (EFSA 2006; Delen 2016).

Propamocarb hydrochloride ile ilgili kimyasal bilgiler Çizelge 2.2'de verilmiştir (EPA 1).

Çizelge 2.2. Propamocarb hydrochloride ile ilgili kimyasal bilgiler (EPA 1)

Kimyasal Adı	propyl[3-(dimethylamino)propyl]carbamatemonohydrochloride
EPA Kimyasal Kodu	119302
CAS Numarası	25606-41-1
Moleküler formülü	$C_9H_{21}ClN_2O_2$
Moleküler ağırlığı	224.73
Fiziksel durumu	Sıvı
Suda çözünebilir	>700 g/L

Propamocarb hydrochloride, tütün, domates, ay çiçeği, patates ve hıyar bitkilerinde çökerten ve mildiyö hastalıklarında *Pythium spp., Fusarium spp., Plasmopara halstedii, Phytophthora infestans, Pseudoperonospora cubensis, Rhizoctonia solani, Altenaria spp.*ve *Sclerotinia spp*. türündeki funguslara karşı kullanılır (BKU 2019b). Bitki tarafından yavaş alınır, fakat hızla metabolize olur. Bu yüzden kalıcılığı ve sistemik etkisi azdır. %72.2 propamocarb içeren sulu çözeltinin iki farklı uygulaması patates bitkilerine yapıldığında fungisitin yok olma oranları 10 gün sonra ölçüldüğünde %97.98 ve %75.57 olarak bulunmuştur. Patatesteki yarı ömürleri ise 2.26 gün ve 6.29 gün olarak belirlenmiştir. Propamocarb, *in vivo* şartlarda daha etkilidir. Translaminar özelliğinden dolayı yaprağın diğer tarafındaki *P.infestans*'ın gelişimini etkiler. *Pythium* ve *Phytophthora* türlerinde yağ asitlerinin yapısını etkileyerek membranın sızdırıcılığını artırdığı bildirilmiştir. Propamocarbın nötr lipitlerin sentezini artırırken fosfolipitlerin sentezini azalttığı bulunmuştur (Delen 2016).

Propamocarb hydrochloride, 1985 yılından itibaren ülkemizde kullanılmaktadır. Bu fungisitin yıllara göre ülkemizde tüketim oranları Çizelge 2.3'te verilmiştir (Delen 2016). 2007, 2010 ve 2011 yıllarında tüketim oranlarının arttığı görülmektedir.

2.6.1.1. Propamocarb hydrochloride'in toksisitesi

Memeli laboratuvar hayvanlarını kullanan çalışmalarda, propamocarb hydrochloride'in genel olarak akut toksisite açısından hafif toksik olduğu gösterilmiştir. Propamocarb hydrochloride oral, dermal ve göz tahrişi açısından hafif toksik olarak sınıflandırılmaktadır, pratik olarak akut solunumda toksik, deri tahrişi bakımından toksik olmayan şeklinde sınıflandırılmaktadır. Fungisitin dermal duyarlaştırıcı olmadığı da gözlenmiştir. Sistemik etkiler açısından, NOEL=150 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (EPA 1995). EFSA (2006)'ya göre de propamocarb hydrochloride düşük akut oral, dermal ve inhalasyon toksisitesine sahiptir (LD_{50} > 2000 mg/kg bw, LC_{50} > 5.01 mg/L).

Çizelge 2.3. Yıllara göre ülkemizde Propamocarb hydrochloride tüketim oranları (Delen 2016)

Yıl	Propamocarb hydrochloride tüketim oranı (ton)
2004	19
2006	39
2007	51
2008	38
2009	33
2010	59
2011	51
2012	41
2013	44

Propamocarb hydrochloride için referans doz (RfD)=0.11 mg/kg/gün olarak hesaplanmıştır. RfD, belirsizlik faktörlerini dikkate alarak pestisitin tahmini kabul edilebilir günlük alımıdır. Bu RfD değeri, beagle köpeklerinde 2 yıllık beslenme çalışmasının sonuçlarında bulunan LOEL=1000 ppm (33.3 mg/kg/gün) değerine dayanmaktadır (EPA 1995). Memelilerde akut toksisite dozu 1330 mg ai./kg bw/gün'den büyüktür, uzun dönem toksisite dozu ise 104 mg ai/kg bw/gün'dür (EFSA 2006).

Akut sıçan oral LD_{50}, erkeklerde 2900 mg/kg, dişilerde 2000 mg/kg olarak bulunmuştur. Akut sıçan dermal LD50, 3000 mg/kg'a eşit veya daha azdır. Sıçanlarda akut (4 saat) solumada LC_{50}>7.9 mg/l olarak tespit edilmiştir. Propamocarbın, kobaylarda cilt hassaslaştırıcı olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, propamocarb hyrochloride, akut oral, dermal toksisite ve göz tahrişi bakımından Toksisite Kategori III olarak, akut soluma toksisitesi ve deri tahrişi bakımından Kategori IV olarak sınıflandırılmıştır (EXTOXNET 1997).

Beagle köpeklerde yapılan 90 günlük bir besleme çalışmasında propamocarb, diyetlerine 0, 50, 100, 500 ve 1000 / 2000 ppm konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Tedavi ile ilgili hiçbir bulgu gözlenmemiştir (EXTOXNET 1997).

Sprague-Dawley sıçanları ile 21 günlük bir dermal toksisite çalışmasında, 21 günlük bir süre boyunca sıçanlara haftada 5 gün, günde 6 saat, 0, 100, 500 ve 1000 mg/kg/gün dozlarında propamocarb dermal yoldan uygulanmıştır. Tedaviye bağlı bir etki gözlenmemiştir (EPA 1).

Beagle köpeklerinde 2 yıllık bir besleme çalışmasında diyetlerine 0, 1000, 3000, 10000 ppm propamocarb eklenmiştir. Tüm tedavi gruplarında azalmış kilo artışı, azalmış gıda verimi, akut gastrik mukozal erozyon görülme sıklığındaki artış, kronik aşındırıcı gastrit sıklığındaki artış not edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışma için bir NOEL belirlenmemiş ancak en düşük doz seviyesinden biraz daha düşük doz test edilmiştir (33.3 mg/kg/gün) (EXTOXNET 1997).

2.6.1.2. Propamocarb hydrochloride'in genotoksisitesi

Salmonella ve *E.coli* gen mutasyon analizleri, farelerde yapılmış iki mikronükleus deneyi, kültürdeki insan lenfositleri kullanılarak yapılan bir *in vitro* memeli sitogenetik deneyi, bir maya mitotik gen dönüşüm deneyi ve bir maya mitotik rekombinasyon deneyi içeren çalışmalar incelendiğinde propamocarb hydrochloride için genotoksisite kanıtı gözlenmemiştir (EXTOXNET 1997).

Fenarimol ve propamocarbın genotoksik etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada Swiss albino farelerde kemik iliği mikronükleusu ve kromozom sapmaları testleri yapılmıştır. Farelere intraperitonal olarak 50, 100, 200 ve 400 mg/kg bw olmak üzere dört farklı dozda fenarimol ve propamocarb enjekte edilmiştir. Fenarimol, tedaviden 24, 36 ve 48 saat sonra mikronükleer eritrositlerde önemli bir artışa neden olmamıştır, ancak bütün doz gruplarında ve örnekleme aralıklarında polikromatik/normokromatik eritrositlerin oranını azaltmıştır. Fenarimol, kromozom sapmalarının sayısını önemli ölçüde arttırmamış, fakat daha yüksek dozlarda mitotik indeksi düşürmüştür ($p<0.05$). Propamocarb, mikronükleer eritrositlerin frekansını arttırmamış, ancak tüm örnekleme aralıklarında polikromatik/normokromatik eritrosit oranını azaltmıştır. Propamocarb sadece toplam kromozom anomalilerindeki boşlukları arttırmış, fakat boşluklar hariç tutulduğunda kontrol grubu ile doz grupları arasında toplam anormallikler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Propamocarb, negatif kontrol grubuna göre mitotik indeksi de düşürmüştür ($p<0.001$). Bu sonuçlara göre, fenarimol ve propamocarbın *in vivo* fare kemik iliğinde genotoksik olmadığını ancak sitotoksik etkileri olabileceği ifade edilmiştir (Aydemir ve Bilaloğlu 2004).

Propamocarbın, kemirgenlerde kanserojen olmadığı bildirilmiştir. Propamocarb *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite açısından yeterli sayıda testte negatif sonuç verdiğinden, propamocarbın genotoksik olmasının muhtemel olmadığı ifade edilmiştir. Genotoksisite eksikliği, farelerde ve sıçanlarda kanserojenliğin bulunmadığı göz önüne alındığında, propamocarbın insanlarda kanserojen risk oluşturmasının muhtemel olmadığı ifade edilmiştir (FAO 2013a).

Çizelge 2.4'te Propamocarb hyrochloride ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları verilmiştir (FAO 2013a). Çalışmaların hepsinde negatif sonuç elde edilmiştir. Propamocarb hyrochloride ile ilişkili genotoksik veya kanserojen olduğuna dair bir kanıt yoktur (EFSA 2006).

Çizelge 2.4. Propamocarb hyrochloride ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları (FAO 2013a)

Çalışma	Tür/Hücre Hattı ve Dozları	Aktif madde yüzdesi	Etkisi
In vitro mutajenite testi (Ames test)	*S. typhimurium* TA98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538 ve *E. coli* WP2uvrA	%66.5	Negatif
E. coli WP2uvrA	*In vitro* mutajenite testi (Ames test)	%69.1	Negatif
İnsan lenfositleri	*In vitro* Kromozom aberasyon testi	%68.6	Negatif
Fare lenfoma L5178Y (TK+/-) hücreleri	*In vitro* gen mutasyon testi OECD 476	%71.1	Negatif
CD-1 fare	*In vivo* mikronükleus testi OECD 474	%70.2	Negatif

2.6.1.3. Propamocarb hydrochloride'in kanserojen etkisi

Propamocarb hydrochloride, D grubu kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma, propamocarb hydrochloride'de olduğu gibi, yeterli veri eksikliğinden dolayı insan ve hayvanda kanserojenlik kanıtı bulunmayan malzemeler için kullanılır. Kanserojen olduğuna dair herhangi bir kayıt olmadığı ifade edilmiştir (EPA 1995).

2.6.1.4. Propamocarb hydrochloride'in mutajenik etkisi

Fungisit ile ilgili hiçbir mutajenite veya nörotoksisite kanıtı bulunmamıştır (EPA 1995).

2.6.1.5. Propamocarb hydrochloride'in ekolojik etkileri

Propamocarb hydrochloride'in pratikte kuşlarda akut oral toksisitede, kuşlarda subakut diyet toksisitesinde, tatlı su balığı akut toksisitesinde, tatlı su omurgasızları akut toksisitesinde ve memeli akut oral toksisitesinde toksik olmadığı görülmüştür. Haliç/deniz akut toksisitesi, mysid karides için pratik olarak toksik olmayan ve doğu

istiridyesi için az toksik bulunmuştur. Yeterli veri bulunmamasından dolayı karasal bitkiler veya kronik avian toksisitesi açısından tahmin yapılamamıştır (EPA 1995).

Sucul ortamda propamocarb hydrochloride'in bozulması için fotodegradasyonun uygun bir yol olmadığı ifade edilmiştir. Sucul organizmalar için düşük akut ve kronik risk vardır. Arılar için riskin düşük olduğu düşünülmektedir (EFSA 2006).

Propamocarb hydrochloride kuşlar için toksik değil şeklinde sınıflandırılmıştır (EXTOXNET 1997).

Propamocarbın *Daphnia* üzerindeki toksikolojik incelemelerinde 48 saat EC_{50} 295 mg/l, yine 48 saat Gözlenmeyen Etki Konsantrasyonu (NOEC) 126 mg/l olarak bulunmuştur. Propamocarb hyrochloride'in suda yaşayan organizmalar için çok düşük toksisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (EXTOXNET 1997).

Propamocarb hydrochloride'in *Apis mellifera* ile temas toksisitesi 100 µg/arı'nın üzerinde bulunmuştur. *Apis mellifera*'ya verilen oral LD_{50} propamocarb hydrochloride, 84 µg/arı'dan büyük olduğu ifade edilmiştir (FAO 2013a).

2.6.1.6. Propamocarb hydrochloride'in bitki üzerinde kalıntı miktarları

Gıdalarımız ve hayvan yemleri üzerinde bazen tarım ürünlerinde kullandığımız pestisitlere veya bunların metabolitlerine rastlayabilmekteyiz. Bu kalıntı miktarları belli bir dozun üzerinde olduğunda sağlığı tehdit etmektedir. Propamocarb hydrochloride'in son ilaçlama ile hasat arasındaki tavsiye edilen süre minimum 3 gündür (BKU 2019b). Bu sürenin kısa olması kalıntı olmaması bakımından avantaj sağlar.

Yapılan deneyler sonucunda pestisitler için ADI değerleri belirlenir. Bu pestisite sürekli maruz kalındığı varsayıldığında, her gün hangi dozda alınırsa herhangi bir negatif etki görülmeyeceği belirlenir. Sıçanlarla yapılan 52 haftalık çalışmada NOEL=29 mg/kg bw/gün olarak belirlenmiştir. Buna göre de propamocarb hydrochloride için ADI=0.29 mg/kg bw/gün, RfD=1 mg/kg bw gün olarak kararlaştırılmıştır. LD_{50}oral=LD_{50}>2000 mg/kg bw (EFSA 2006). EPA ise RfD değerini 0.11 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (EPA 1). Propamocarb hydrochloride'in dört ana metaboliti tanımlanmıştır (EFSA 2006).

Çizelge 2.5'de EFSA (2006) tarafından Avrupa Birliği ülkeleri için tanımlanan ve Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (2016)'ne göre Türkiye için tanımlanan propamocarb hydrochloride için tarım ürünleri üzerinde bulanabilecek MRL değerleri verilmiştir. Ülkemizde kabul edilen MRL değerlerinin Avrupa ülkelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.5. Propamocarb hydrochloride için EFSA (2006) ve Türk Gıda Kodeksi (2016) MRL değerleri

Tarım Ürünleri	**Propamocarb hydrochloride için AB MRL oranları (mg/kg)**	**Propamocarb hydrochloride için Türkiye MRL oranları (mg/kg)**
Marul	30	40
Domates	0.1	4
Patates	0.1	0.3
Diğer bitkisel gıdalar	0.05	
Ayçiçeği tohumu		0.01
Hıyar		5
Biber		3

2.6.2. Kresoxim methyl

Kresoxim methyl, geniş spektrumlu bir fungisittir ve strobilurin ailesinin yeni bir üyesidir. Strobilurin A ile yapısal olarak ilişkili olan biyolojik olarak aktif bileşiklerin yeni bir sınıfıdır. QoI grubundan oximino-acetate'lar sınıfındandır (Delen 2016). Odun mantarı olan *Strobilurus tenacellus*'den elde edilen doğal bir üründür (FAO/WHO 1998). Avrupa'daki *Pinus sylvestris*'in çürüyen çam kozalaklarında doğal olarak bulunan *S. tenacellus*'tan (Şekil 2.4), strobilurin A ve B'nin orijinal izolasyonları yapılmıştır (Ypema ve Gold, 1999).



Şekil 2.4. Doğal strobulinlerin elde edildiği önemli bir bazitli mantar *Strobilurus tenacellus* (Ypema ve Gold 1999)

Kresoxim methyl ile ilgili kimyasal bilgiler Çizelge 2.6'da verilmiştir (EPA 1998).

Çizelge 2.6. Kresoxim methyl ile ilgili kimyasal bilgiler (EPA 1998)

Kimyasal Adı	Methyl(E)-methoxyimino-2-[2-(o-tolyloxymethyl)phenyl] acetate
EPA Kimyasal Kodu	129111
CAS Numarası	143390-89-0
Moleküler formülü	$C_{18}H_{19}NO_4$
Moleküler ağırlığı	313.8
Fiziksel durumu	Katı
Suda çözünebilir	2 ppm

Kresoxim methyl, ülkemizde 1998 yılından beri kullanılmaktadır. Bu fungisitin yıllara göre ülkemizde tüketim oranları Çizelge 2.7'de verilmiştir (Delen 2016).

Çizelge 2.7. Yıllara göre ülkemizde kresoxim methyl tüketim oranları (Delen 2016)

Yıl	**Kresoxim methyl tüketim oranı (ton)**
2004	2
2006	5
2007	5
2008	5
2009	6
2010	11
2011	16
2012	11
2013	10

Kresoxim methyl, domates, şeftali, bağ, turunçgiller, elma, hıyar, kabak, kavun ve karpuz bitkilerinde külleme, kahverengi nokta ve elma kara lekesi hastalıklarında *Leveillula taurica, Sphaerotheca pannosa, Erysiphe necator, Alternaria alternata f.sp.citri* ve *Venturia inaequalis* türündeki funguslara karşı kullanılır (BKU 2019a). Kresoxim methylin etkili olduğu patojenler ve etki dereceleri Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Kresoxim-methyl aktivite spektrumu (+++: Mükemmel, ++: İyi, +: Tatmin edici, -: Yetersiz, P: Önleyici olarak uygulandığında tatmin edici (Ypema ve Gold 1999)

Ürün	**Patojen**	**Aktivite**
Elma	*Venturia inaequalis*	+++
	Podosphaera leucotricha	+++
	Gloeodes pomigena	+++
	Zygophiala jamaicensis	+++
	Mycosphaerella pomi	++
	Botryosphaeria obtusa	++
	Botryosphaeria dothidea	++
	Gymnosporangium sp.	P
	Gymnosporangium clavipes	P
	Colletotrichum sp.	–
	Helminthosporium papulosum	–
Brokoli	*Peronospora parasitica*	P
Kiraz	*Podosphaera clandestina*	+++
Hububat	*Erysiphe graminis*	+++
Kabakgiller	*Sphaerotheca fuliginea*	+++
	Didymella bryoniae	+++
	Pseudoperonospora cubensis	P
Üzüm	*Uncinula necator*	+++
	Guignardia bidwellii	+++
	Phomopsis viticola	++
	Plasmopara viticola	P
Marul	*Erysiphe cichoracearum*	+++
	Bremia lactucae	P

Çizelge 2.8.'in devamı

Ürün	Patojen	Aktivite
Pikan cevizi	*Cladosporium caryigenum*	+++
Armut	*Venturia pirina*	+++
	Podosphaera leucotricha	+++
Gül	*Sphaerotheca pannosa*	+++
	Diplocarpon rosae	+++
	Phragmidium sp.	P

2.6.2.1. Kresoxim methylin toksisitesi

FAO/WHO (1998)'e göre kresoxim methylin düşük akut toksisitesi vardır. Non-genotoksik karsinojen ve tümör başlatıcıdır.

Subkronik bir oral toksisite çalışmasında, sıçanların 3 ay boyunca diyetlerine 0, 500, 2000, 8000, ve 16000 ppm (erkekler için 0, 36, 146, 577 ve 1170 mg/kg/ gün ve dişiler için 0, 43, 172, 672 ve 1374 mg/kg/gün) kresoxim methyl uygulanmıştır. Çalışmada erkek sıçanlar için LOEL, serum GGT'ye bağlı olarak 8000 ppm (577 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Erkeklerde NOEL=2000 ppm (146 mg/kg/gün), dişilerde ise 16000 ppm'dir (1374 mg/kg/gün) (EPA 1998).

Fareler üzerinde yapılan bir oral subkronik toksisite çalışmasında, diyetlere 0, 250, 1000, 4000 ve 8000 ppm (erkekler için 0, 57, 230, 909 ve 1937 mg/kg/gün, dişiler için 0, 80, 1326 ve 2583 mg/kg/gün) dozlarında kresoxim methyl uygulanmıştır. Her iki cinsiyet için de bir LOEL belirlenmemiştir. NOEL 8000 ppm olarak bulunmuştur (erkekler için 1937 mg/kg/gün, dişiler için 2583 mg/kg/gün) (EPA 1998).

Tekrarlanan bir dermal toksisite çalışmasında, sıçanlara 21 gün boyunca günde 6 saat 0 ve 1000 mg/kg/gün dozlarında dermal maruziyet yapılmıştır. NOEL 1000 mg/kg/ gün olarak bulunmuş, LOEL belirlenmemiştir (EPA 1998).

Kronik bir toksisite çalışmasında, sıçanlara diyetlerinde 24 ay boyunca 0, 200, 800, 8000 veya 16000 ppm (erkekler için 0, 9, 36, 370 ve 746 mg/kg/gün ve dişiler için 0, 12, 48, 503 ve 985 mg/kg/gün) dozlarında kresoxim methyl verilmiştir. Hem erkek hem de dişi sıçanlar için LOEL 8000 ppm olarak belirlenmiştir (erkeklerde 370 mg/kg/gün, dişiler 503 mg/kg/gün). LOEL hesaplanırken erkeklerde SGGT seviyelerinin artmasına, karaciğerin ağırlığına ve histopatolojik değişikliklere bakılmıştır. Dişilerde ise kabaca %10 daha düşük vücut ağırlıkları ve çalışma boyunca kilo alımlarına bakılmıştır. Her iki cinsiyet için NOEL 800 ppm olarak bulunmuştur (erkeklerde 36 mg/kg/gün ve dişilerde 48 mg/kg/gün) (EPA, 1998).

Köpekler üzerinde yapılan kronik bir toksisite çalışmasında, diyetlerine 12 ay boyunca 0, 1000, 5000 veya 25000 ppm (erkeklerde 0, 27, 138 veya 714 mg/kg/gün ve dişilerde 0, 30, 146 veya 761 mg/kg/gün) kresoxim methyl eklenmiştir. LOEL, erkekler için 25000 ppm (714 mg/kg/gün) bulunmuştur, bu değer azalmış ortalama vücut ağırlığı, vücut ağırlığı artışı ve düşük gıda verimi temeline dayanır. Dişiler için LOEL tanımlanmamıştır. Erkekler için NOEL 5000 ppm (138 mg/kg/gün) ve dişiler içinse 25000 ppm (761 mg/kg/gün) olarak bulunmuştur (EPA 1998).

2.6.2.2. Kresoxim methylin genotoksisitesi

Kresoxim methylin genotoksik potansiyeli bakterilerde ve memeli hücrelerinde gen mutasyon testi, planlanmayan DNA sentezi, *in vitro* sitogenetik, *in vivo* mikronükleus testleri ile araştırılmıştır. Kresoxim methylin, eksojen metabolik aktivasyon ile *in vitro* kromozomal sapmaları indüklemek için orta potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir, ancak pozitif etkiler sıçan kemik iliğinde mikronükleus testleri dahil olmak üzere başka hiçbir testte gözlenmemiştir. FAO/WHO'nın toplantısında kresoxim methylin genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Sıçanlardaki üç ana metabolit *Salmonella typhimurium*'da *in vitro* olarak ters mutasyona neden olmamıştır (FAO/WHO 1998).

Bir başka çalışmada, kresoxim methyl yine genotoksik etki göstermemiş, fakat sıçanlarda maksimum dozda karaciğer tümörlerine sebep olmuştur (EFSA 2010a, Krieger 2001). Kresoxim methyl ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları Çizelge 2.9'da verilmiştir.

2.6.2.3. Kresoxim-methylin kanserojen etkisi

Bir kanserojenik besleme çalışmasında, 24 ay boyunca sıçanların diyetlerine 0, 200, 800, 8000 veya 16000 ppm (erkekler için 0, 9, 36, 375 ve 770 mg/kg/gün ve dişiler için 0, 12, 47, 497 ve 1046 mg/kg/gün) kresoxim methyl uygulanmıştır. Hem erkek hem de dişiler için LOEL 8000 ppm bulunmuştur (erkekler için 375 mg/kg/gün, dişiler için 497 mg/kg/gün). Erkeklerde bu değer, vücut ağırlığındaki biraz azalmaya, vücut ağırlığındaki kilo artışına, brüt ve mikroskobik karaciğer (ve safra) lezyonlarındaki artışa göre hesaplanmıştır. Dişilerde LOEL, azalmış vücut ağırlıkları, kilo artışları ve karaciğer kitlelerinin görülme sıklığındaki artışa dayanmaktadır. Her iki cinsiyet için NOEL 800 ppm olmuştur (erkeklerde 36 mg/kg/gün, dişilerde 47 mg/kg/gün). Karaciğer karsinomu, sıçanların her iki cinsiyetinde primer neoplastik bulgu olmuştur; histopatolojik bulgular ile uyumlu bulunmuştur (EPA 1998).

Çizelge 2.9. Kresoxim methyl ile yapılan bazı genotoksisite çalışmaları (PMRA 2003)

Çalışma	**Tür/Hücre Hattı ve Dozları**	**Uygulanan Doz**	**Etkisi**
Ames test, nokta mutasyonu	*Salmonella typhimurium*, TA 98 ve TA 100 *Escherichia coli*	0, 20, 100, 500, 2500 ve 5000 µg/petri ± S9	Negatif
Ames test, nokta mutasyonu	*Escherichia coli* CM 881 (WP2 trp uvrA pKM 101)	0, 20, 100, 500, 2500 ve 5000 µg/petri ± S9	Negatif
Memeli kromozom aberasyon testi (*in vitro*)	İnsan periferal lenfositleri	0, 10, 20 ve 40 µg/mL ± S9	Negatif
Mikronükleus testi (*in vivo*)	Fare CrlBr (5/cinsiyet/doz) tek intraperitoneal doz	0, 500, 1000 ve 2000 mg/kg Hücreler son uygulamadan 16, 24, 48 ve 72 saat sonra hasat edilmiştir.	Mikronükleus negatif, 30 dk sonra tüm dozlarda toksisitenin klinik belirtileri gözlenmiştir.
UDS *in vitro* (DNA hasarı ve tamiri)	Sıçan hepatositleri (Wistar)	0.33, 1.0, 3.33, 10.0, 33.3 ve 100.0 µg/mL	Negatif
UDS *ex vivo* (DNA hasarı ve tamiri)	Sıçanlar, Wistar, oral gavaj ile tek doz	0, 20, 200 ve 1000 mg/kg bw	Negatif
UDS *ex vivo* (DNA hasarı ve tamiri)	Sıçanlar, Wistar, 3 grup, üç hafta besleme	0, 200 ve 16000 ppm (0, 4.79 ve 441.87 mg/kg bw)	Negatif
Memeli sitogenetiği (*in vitro*)	CHO/HGPRT	0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 ve 100.0 µg/mL ± S9 veya 1.0, 2.15, 4.64, 10.0, 21.5, 46.4 ve 100.0 µg/mL ± S9	Negatif

Farelerdeki bir kanserojenite toksisite çalışmasında, farelerin diyetlerine 18 ay 0, 400, 2000 ve 8000 ppm (erkeklerde 0, 60, 304 ve 1305 mg/kg/gün ve dişilerde 0, 81, 400 ve 1662 mg/kg/gün) doz seviyelerinde kresoxim methyl uygulanmıştır. Ek 10 hayvan daha 12 ay bir uydu çalışmasında tedavi edilmiştir. LOEL, dişiler için 2000 ppm (400 mg/kg/gün) olarak bulunmuştur; bu değer azalan kilo alımına dayanmaktadır. LOEL erkekler için 8000 ppm (1350 mg/kg/gün); bu değer azalan kilo alımına ve karaciğer amiloidozuna dayanmaktadır. Dişiler için NOEL 400 ppm (81 mg/kg/gün) ve erkekler için 2000 ppm (304 mg/kg/gün) olmuştur. Dozlar test edildiğinde ve kontrollerle karşılaştırıldığında tümör insidansında uygulamaya bağlı bir artış olmamıştır. Dozlama yeterli kabul edilmiştir ve yüksek doz oranı her iki cinsiyet için 1000 mg/kg/gün limit dozun üstünde yapılmıştır (EPA 1998).

2.6.2.4. Kresoxim methylin mutajenik etkisi

Mutajenite çalışmaları olarak *Salmonella*/memeli aktivasyon geni mutasyon analizi, Çin hamsteri yumurtalık CHO hücrelerinde kültür gen mutasyonu tahlili, insan lenfositlerinde *in vitro* kromozomal sapmalar deneyi ve farelerde *in vivo* mikronükleus deneyi yapılmıştır. Diğer genotoksisite çalışmaları olarak da primer sıçan hepatositlerinde ve sıçan hepatositlerinde planlanmamış DNA sentezine bakılmıştır. Mevcut çalışmalara dayanarak, şu anda mutajenite endişesinin olmadığı belirtilmiştir (EPA 1998).

2.6.2.5. Kresoxim methylin ekolojik etkileri

EFSA (2010a) kresoxim methylin hedef olmayan organizmalar için düşük bir riski olduğunu söylemekle beraber özellikle sucul organizmalar üzerinde çok toksik etkileri bulunduğunu belirtmiştir. Arılar, solucanlar, hedef olmayan eklembacaklılar, toprak mikroorganizmaları ve hedef olmayan bitkiler için düşük risk oranında olduğu belirtilmiştir. PMRA (2003) ise, uğur böcekleri için potansiyel risk oluşturduğunu bildirmiştir.

Bir bıldırcın türünde tek doz LD_{50} testi yapılmıştır ve LD_{50}> 2150 mg ai(aktif madde)/kg olarak bulunmuştur. Av kuşları türlerine pratik olarak toksik olmadığı kabul edilmiştir. NOEL 2150 mg ai/kg olarak belirlenmiştir. Bluegill güneş balıkları ile akut bir LC_{50} testi yapılmıştır ve sonuçta LC_{50}=499 ppb ai'nin yüksek derecede toksik olduğu düşünülmüştür. Gökkuşağı alabalığı ile bir akut LC_{50} testi yapılmış ve LC_{50}=190 ppb ai'nin yüksek derecede toksik olduğu düşünülmüştür. Benzer bir test kresoxim methylin (BAS 490-1) metaboliti kullanılarak yapılmıştır. LC_{50}>104 ppm ai/l'nin pratik olarak toksik olmadığı kabul edilmiştir. Kresoxim methylin seralarda gıda dışı kullanımlarda olumsuz etkileri olmasının muhtemel olmadığı ifade edilmiştir (EPA 1998).

Cui vd. 2017, üç strobilurin fungisitin (kresoksim methyl, piraklostrobin ve trifloxistrobin) sucul organizmalara toksisitesini araştırmak için *Daphina magna* ile çalışmıştır. Yenidoğan akut immobilizasyon testinde kresoxim methlyin 48 saatlik %50 efektif konsantrasyon (EC_{50}) değerleri 443.3mg/L olarak bulunmuştur. Ayrıca önemli bir detoksifikasyon enzimi olan glutatyon S-transferazın (GST) aktivitesi önemli ölçüde indüklenmiş ve akut maruziyetten sonra GST aktivitesi ve *D. magna* immobilitesi arasında anlamlı bir pozitif ilişki bulunmuştur. *D. magna* embriyolarında daha yüksek toksisite göstermiş ve 48 saat EC_{50}=157.3 mg/L olarak bulunmuştur. Yapılan testler,

strobilurinlerin subletal konsantrasyonlarda, *D. magna*'nın üremesini, gelişmesini ve büyümesini de önemli ölçüde etkileyebileceğini ortaya koymuştur. LOEL=20 mg/L olarak bulunmuştur. Strobilurin fungisitlerinin *D. magna* için çok toksik olduğu belirlenmiştir.

Liu vd. (2013), kresoxim methylin akut toksisitesini ölçmek için Çin'de önemli bir balık türü olan ot sazanının (*Ctenopharyngodon idella)* erken yaşam evresindeki bireylerini kullanmışlardır. Juveniller için LC_{50}= 0.338(0.284–0.407) mg/L olarak bulmuşlardır. Fungisitin, katalaz ve peroksidaz enzim aktivitesini artırdığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azalttığı, büyüme ile ilgili üç geni (IGF-1, IGF-2 ve GHR) ve enerji ile ilgili iki geni (CCK ve PYY) önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Kresoxim methylin sucul organizmalara ciddi zararlar verebileceği ifade edilmiştir.

Ypema ve Gold (1999) kresoxim methylin balıklar, *Daphnia* ve yeşil alg üzerine toksisitesinin olduğunu, uygun kullanma ve imha prosedürünün organizmaların bu maddeye maruz kalmasını önleyeceğini belirtmişlerdir.

2.6.2.6. Kresoxim methylin bitki üzerindeki kalıntı miktarları

Pestisit kullanımının olumsuz yanlarından biri de pestisitlerin veya metabolitlerinin tarım ürünleri üzerinde uzun süre kalabilmesidir. Bu şekilde insanlarda ve bu yemlerle beslediğimiz hayvanlarda toksik etkiler görülebilmektedir (EFSA 2015b, Gawel vd. 2019).

Kresoxim methylin son ilaçlama ile hasat arasındaki tavsiye edilen süresi domateste 3 gün; hıyar, kabak, kavun ve karpuzda 4 gün; şeftalide 21 gün; bağ, turunçgil ve elmada 35 gündür (BKU 2019). İnsanlar için ADI= 0-0.4 mg/kg bw'dir (FAO/WHO 1998). Kanada Haşere Yönetimi Düzenleyici Kurum (PMRA) ise 0.36 mg/kg bw ile daha düşük bir ADI dozu önermiştir (PMRA 2003).

Ülkeler, pazarlarına sunulan tarım ürünleri için, belirledikleri MRL değerleri bakımından testler yapmakta, ithalatlarını buna göre düzenlemektedirler. Çizelge 2.10'da EFSA'nın (2014) Avrupa Birliği ülkeleri için ve Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (2016)'ne göre Türkiye için tanımlanan bazı tarım ürünleri üzerinde bulunabilecek maksimum kresoxim methyl kalıntı seviyeleri verilmiştir. Ülkemizde kabul edilen MRL değerlerinin portakal, elma, domates, karpuz ve kavunda Avrupa ülkelerinden daha yüksek, üzüm ve hıyarda aynı, kabak ve şeftalide ise daha düşük olduğu görülmektedir.

EFSA, 2015 yılında kresoxim methyl için pırasada bulunabilecek MRL değerini 6 mg/kg'dan 10 mg/kg'a çıkarılmasını önermiştir (EFSA 2015).

Çizelge 2.10. EFSA (2014) tarafından Avrupa Birliği ülkeleri için ve Türk Gıda Kodeksi (2016) tarafından Türkiye için tanımlanan tarım ürünleri üzerinde bulanabilecek kresoxim methyl MRL değerleri

Tarım Ürünleri	**Kresoxim methyl için AB MRL oranları (mg/kg)**	**Kresoxim methyl için Türkiye MRL oranları (mg/kg)**
Portakal	0.05	0.5
Elma	0.02	0.2
Armut	0.02	
Yenidünya	0.02	
Kayısı	0.05	
Domates	0.5	0.6
Şeftali	0.05	0.01
Üzüm	1	1
Hıyar	0.05	0.05
Kabak	0.2	0.05
Kavun	0.2	0.3
Karpuz	0.2	0.3

Kresoxim methylin 3 ana metaboliti vardır: 490M1, 490M2 (serbest ve glikoza bağlı olarak) ve 490M9 (serbest ve glikoza bağlı olarak) (PMRA 2003). Kresoxim methyl kalıntıları içeren buğday (olgunlaşmamış bitkiler, tahıl ve saman) ve elma örnekleri bir çalışma süresince -18^{o}C'de depolanmıştır; bu süre tahıl için 214 gün, saman için 91 gün, yem için 168 gün ve elma için 295 gündür. 21 ay depolanan dondurulmuş buğday örneklerinde, 14 ay depolanan elma örneklerinde, 8 ay depolanan üzüm örneklerinde ve 21 ay depolanan kanatlı örneklerinde radyoaktif kalıntıların kalitatif veya kantitatif bileşimlerinde belirgin bir değişiklik olmamıştır (FAO/WHO, 1998). Metabolitler gıda üzerinde uzun süre kalabilmektedirler.

Birçok kalıntı çalışmasında, kresoxim methylin metabolitleri olan 490M2 ve 490M9 bulunmuştur, ancak bu metabolitlerin düşük toksisiteye sahip olduğu düşünülmüştür. Ruminantlarda, kalıntının ana bileşeni metabolit 490M9'dur, bileşik sadece çok düşük bağıl konsantrasyonlarda bulunmuştur. Kanatlılarda 490M9, karaciğerde bulunan ana bileşik olduğu için uygun bir gösterge bileşiği olabileceği düşünülmüştür. (FAO/WHO, 1998).

2.6.3. Hymexazol

İsoxazole grubu bir fungisittir. Toprak patojenlerine karşı etkilidir. Tohuma ve toprağa uygulanabilmektedir. Fungisit etkisinin yanında, yan kök ve kılcal kök gelişimini artırarak bitki gelişimini hızlandırmaktadır. Bitkilerin soğuğa dayanıklılığını da artırmaktadır. ABD'de şekerpancarı tohumlarında yaygın olarak kullanılır. Tohum fungisiti olarak kullanıldığında, toprak nemi ve sıcaklığına bağlı olarak etkililik süresi birkaç haftaya kadar sürebilmektedir. Kökler yoluyla çabuk alınabilmekte fakat bitki içinde uzun mesafelere taşınamamaktadır. İki metabolitinden O-glycoside fungisit etki gösterirken, N-glycoside bitki gelişimini hızlandırır (Delen 2016). Hymexazol ile ilgili kimyasal bilgiler Çizelge 2.11'de verilmiştir.

Çizelge 2.11. Hymexazol ile ilgili kimyasal bilgiler (EFSA 2010b)

Kimyasal Adı	5-methyl-3 (2H)-isoxazolone
CAS Numarası	10004-44-1
Moleküler formülü	$C_4H_5NO_2$
Moleküler ağırlığı	99.15
Fiziksel durumu	Katı
Suda çözünebilir	20°C'de 65.1 g/l, tamponsuz su (%99.1) 20°C'de 58.2 g/l, pH 3 (%99.1) 2°C'de 67.8 g/l, pH 9 (%99.1)

Hymexazol domates, tütün, biber, hıyar ve muz bitkilerinde çökerten ve *Fusarium* solgunluğu hastalıklarında *Fusarium spp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, Alternaria spp., Sclerotina spp., Phytophthora spp.* ve *Bipolaris spp*. türündeki funguslara karşı kullanılır (BKU 2019c).

Vera vd. (2011)'nin bildirdiğine göre, *Fusarium* veya *Pythium* gibi toprak kaynaklı hastalıkları kontrol etmek için kullanılır. Örneğin; pirinç, sebze, şeker pancarı veya tütün bitkilerinde yaygın olarak kullanılır. Bitkiye girdiğinde hymexazol hızla glukozitlere dönüşür. O-glukozit, RNA ve DNA sentezi ile etkileşimin bir sonucu olarak fungitoksisite aktivitesine sahipken, N-glukozit bitki büyümesini teşvik edici etkilerle ilişkilendirilmiştir. Toprakta hymexazolün biyolojik olarak çözünmesinin 10-30 gün aralığında gerçekleştiği bildirilmiştir ve bu nedenle kalıcı bir bileşik olarak sınıflandırılmaktadır (Roberts vd. 1999).

Hymexazol, ülkemizde 1989 yılından beri kullanılmaktadır. Bu fungisitin yıllara göre ülkemizde tüketim oranları Çizelge 2.12'te verilmiştir (Delen 2016).

Çizelge 2.12. Yıllara göre ülkemizde hymexazol tüketim oranları (Delen 2016)

Yıl	**Hymexazol tüketim oranı (ton)**
2004	14
2006	20
2007	13
2008	5
2009	14
2010	26
2011	30
2012	27
2013	32

2.6.3.1. Hymexazolün toksisitesi

Oral uygulamadan sonra hızla ve yoğun bir şekilde absorbe edilen hymexazol, esas olarak idrar yoluyla hızla atılır (24 saat içinde>%95). Metabolizma esas olarak sülfürik ve glukuronik asitlerle konjugasyon yoluyla ortaya çıkar. Akut toksisite sonuçlarına dayanarak hymexazol;

- ✓ "Yutulduğunda sağlığa zararlıdır.",
- ✓ "Gözlere ciddi zarar verme riski vardır.",
- ✓ "Cilt ile temasında hassasiyet oluşturabilir."
- ✓ "Anne karnındaki çocuğa zarar riski olasılığı vardır." olarak sınıflandırılmıştır.

Sıçanlarda oral LD_{50}=1600 mg/kg, farelerde oral LD_{50}=1700 mg/kg, tavşanlarda dermal LD_{50}>2000 mg/kg ve sıçanlarda soluma LC_{50}>0.65 mg/l/4 saat (ulaşılabilir en yüksek konsantrasyon, aerosol, tüm vücut) olarak bulunmuştur. Sıçanlarda oral NOEL=371 mg/kg bw/gün (90 gün), farelerde oral NOEL= 55 mg/kg bw/gün (90 gün) ve köpeklerde 17 mg/kg bw/gün (1 yıl) olarak belirlenmiştir (EFSA 2010b).

2.6.3.2. Hymexazolün genotoksisitesi

Genotoksisitenin değerlendirilmesi ile ilgili olarak, hymexazol, sıçanlarda yapılan *in vivo* kromozom aberasyon testinde yüksek doz seviyesinde (2000 mg/kg bw, LD_{50}'ye yakın) hafif pozitif sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, fareler ile yapılan *in vivo* mikronükleus testi, net negatif sonuçlar göstermiştir. Ayrıca fareler ve sıçanlar ile yapılan uzun süreli çalışmalarda kanserojen potansiyel gözlenmemiştir. Hymexazolün

insanlarda genotoksik olma olasılığının düşük olarak kabul edilebileceği ifade edilmiştir (EFSA 2010b).

Tekrarlanan dozlarda yapılan çalışmalarda, kısa süreli maruziyetten sonraki ana hedef organ karaciğer olmuştur (ağırlık, biyokimyasal ve histolojik değişiklikler), ancak uzun süreli çalışmalarda böbrekte (farede) ve tiroidte (sıçanda) de ağırlık artışı görülmüştür. 1 yıllık çalışmada NOEL=17 mg/kg bw/gün değeri olan köpek, en hassas tür olmuştur. Sıçanlarda *in vivo* kromozom aberasyon testinde yüksek dozda hafif klastojenik bulunmuştur. Farelerde *in vivo* mikronükleus testinde genotoksik potansiyeli bulunmamıştır. İnsanlarda genotoksik olma olasılığının düşük olduğu ifade edilmiştir (EFSA 2010b).

2.6.3.3. Hymexazolün kanserojen etkisi

Test edilen yüksek dozlarda tümörijenik etki olduğuna dair kanıt bulunmamıştır (sıçanlarda 532 mg/kg bw/gün; farelerde 2994 mg/kg bw/gün) (EFSA 2010b).

2.6.3.4. Hymexazolün ekolojik etkileri

Böcekçil kuşların kısa dönem için toksisiteye maruz kalma oranlarını araştıran ilk çalışmada düşük risk bulunurken, akut ve uzun dönem toksisiteye maruz kalmayla ilgili domateslerde yapılan çalışmada böcekçil kuşlar için potansiyel akut ve uzun dönem yüksek risk olduğu bulunmuştur. Bu durumun kalıntı miktarları arasındaki farktan olduğu düşünülmüştür (EFSA 2010b).

Domateslerde kullanımında memelilerin toksisiteye maruz kalmasında düşük akut ve kronik bir risk olduğu tespit edilmiştir. Şeker pancarında kullanımında otçul memeliler için düşük bir akut risk tespit edilmiştir (EFSA 2010b).

Hymexazol sucul organizmalar için çok toksiktir. Uzmanlar yaptıkları tartışmalar sonucunda *Daphnia magna* için NOEC=0.8 mg/L yerine EC_{10}=0.4 mg/L değerini kullanmaya karar vermişlerdir. Domateslerde ve şeker pancarında kullanımının sudaki organizmalar için düşük bir risk oluşturduğu düşünülmektedir. RMS (Risk Management Solutions), 2010'da Finlandiya'da 5-metil-2 (3H) -oksazolon metabolitinin hymexazolden 10 kat daha yüksek toksisitede olduğu varsayımına dayanarak bir risk değerlendirmesi sağlamıştır. Şeker pancarında kullanımında düşük risk tespit edilmiştir. Bununla birlikte, dış ortamdaki domateste kullanımında sucul omurgasızlar ve sedimanda yaşayan organizmalar için yüksek bir risk tespit edilmiştir. Metabolit 5-metil-2 (3H) -oksazolon riskini değerlendirmek için daha fazla araştırmanın gerekli olduğu ifade edilmiştir (EFSA 2010b).

Hymexazolün arılar, hedef olmayan eklembacaklılar, solucanlar, topraktaki hedef olmayan mikroorganizmalar, hedef olmayan bitkiler ve biyolojik atık su arıtma yöntemleri için düşük risk oluşturduğu kararlaştırılmıştır. Arılarda akut oral toksisitede LD_{50}>100 µg/arı, akut kontakt toksisitede LC_{50}>100 µg/arı olarak tespit edilmiştir (EFSA 2010b).

2.6.3.5. Hymexazolün bitki üzerinde kalıntı miktarları

Gıdalarımız ve hayvan yemleri üzerinde bazen tarım ürünlerinde kullandığımız pestisitlere veya bunların metabolitlerine rastlanması sağlık için risk oluşturabilir. Hymexazolün son ilaçlama ile hasat arasındaki tavsiye edilen minimum süre domateste ve hıyarda 7 gün, biberde 3 gündür (BKU 2019c).

EFSA (2010b) domateste bulunabilecek MRL değerini 1 mg/kg olarak belirlemiştir. Köpeklerde yapılan bir yıllık çalışma temel alınarak ADI=0.17 mg/kg bw/gün önerilmiştir. Tavşanlarda yapılan gelişimsel NOEL çalışmasına göre akut RfD=0.5 mg/kg bw/gün olarak tespit edilmiştir (EFSA 2010b). Çizelge 2.13'de hymexazol için Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (2016)'ne göre Türkiye için tanımlanan bazı tarım ürünleri üzerinde bulunabilecek maksimum kalıntı seviyeleri verilmiştir.

Çizelge 2.13. Hymexazol için Türk Gıda Kodeksi MRL değerleri

Tarım Ürünleri	**Hymexazol için Türkiye MRL oranları (mg/kg)**
Muz	0.05
Domates	1
Biber	0.05
Hıyar	0.05
Kabak	0.05
Şeker pancarı	0.01

Domateslerde hymexazol metabolizması araştırıldığında en çok hymexazol (Total radyoaktif kalıntının % 17'si) bileşeni kalıntısı, hymexazol N-monoglucoside (Total radyoaktif kalıntının % 36'sı) ve hymexazol O-glukozit olmuştur (Total radyoaktif kalıntının % 16'sı). Meyvelerdeki kalıntı tanımının, sadece hymexazol olarak ve ayrıca risk değerlendirilmesi kalıntı tanımında hymexazol ve glukozid konjugatları (hymexazol-O-glukozit, hymexazol-O-diglucoside ve hymexazol-N-monokozit) olarak tanımlanması gerektiği ifade edilmiştir (EFSA 2010b).

Çin'de iki farklı bölgede karpuzlarda yapılan çalışmaya göre, karpuzlardaki yarı ömrü 3.40 ve 3.13 gün, topraktaki yarı ömrü 3.66 ve 3.67 gün olarak tespit edilmiştir. Karpuzlara % 0.1 doz uygulandığında hasatın son ilaçlamadan 14 gün sonra yapılması önerilmiştir (Delen 2016).

2.6.4. Metiram

Dithiokarbamat grubundan uzun yıllardır kullanılan bir fungisittir. Ethylene

thiourea (ETU)'ya metabolize olur, bu kimyasal da tiroit bezini hedef alır. Çizelge 2.14'de metiram ile ilgili kimyasal bilgiler verilmiştir (EPA 2005).

Çizelge 2.14. Metiram ile ilgili kimyasal bilgiler (EPA 2005)

Kimyasal Adı	Metiram
CAS Numarası	9006-42-2
Moleküler formülü	$(C_{16}H_{33}N_{11}S_{16}Zn_3)_x$
Moleküler ağırlığı	$(1088.6)_x$
Fiziksel durumu	Katı
Suda çözünebilir	2 mg/L

Metiram, elma, domates, turunçgiller, bağ ve tütün bitkilerinde karaleke, erken yaprak yanıklığı, mildiyö, kahverengi leke, ölükol ve mavi küf hastalıklarında *Venturia inaequalis, Alternaria solani, Phytophthora infestans, Alternaria alternata, Phomopsis viticola, Plasmopara viticola* ve *Peronospora tabacina* türündeki funguslara karşı kullanılır (BKU 2019d). Bu fungisitin yıllara göre ülkemizde tüketim oranları Çizelge 2.15'te verilmiştir (Delen 2016).

Çizelge 2.15. Yıllara göre ülkemizde metiram tüketim oranları (Delen 2016)

Yıl	**Metiram tüketim oranı (ton)**
2007	100
2008	100
2009	100
2010	100
2011	100
2012	200
2013	100

2.6.4.1.Metiramın toksisitesi

Akut, kronik ve kanser diyeti (sadece yiyecek) çalışmalarında, metiram ve metiram kaynaklı ETU'nun riski düşük bulunmuştur. Metiram için içme suyuna maruz kalma değerlendirmesi, sadece ETU konsantrasyonlarına yöneliktir. Çünkü metiramın,

yüzeysel veya yeraltı suyu kaynaklarına, insan tüketimi için su sağlayacak bir yere ulaşması için yeterince uzun süre içme suyunda kalması beklenmemektedir. İçme suyu ve yeraltı suyu kaynakları için tahmini ETU konsantrasyonları düşük olduğundan endişe verici bulunmamıştır. ETU'nun potansiyel kanserojen, gelişimsel ve tiroit etkileri vardır (EPA 2005).

Tavşanlarda yapılan çalışmada besinlerine 0.01 mg/kg/gün metiram karıştırıldığında NOEL=10 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan subkronik oral toksisite çalışmasında NOEL=0.4 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (EPA 2005).

2.6.4.2. Ethylene thiourea (ETU)

Ethylene thiourea (ETU) metaboliti, metiram ve diğer EBDC fungisitleri, maneb ve mancozebin çevresel bozunma veya pişirme ile ortaya çıkan yan ürünüdür. Metiram ve diğer EBDC'ler için risk endişelerinin çoğu ETU'den kaynaklanmaktadır. ETU ısıtıldığında azot ve kükürt oksitler yayılır. Çizelge 2.16'da ETU ile ilgili kimyasal bilgiler verilmiştir (EPA 2005).

Çizelge 2.16. ETU ile ilgili kimyasal bilgiler (EPA 2005)

Kimyasal Adı	Ethylene thiourea
CAS Numarası	96-45-7
Moleküler formülü	$C_3H_6N_2S$
Moleküler ağırlığı	102.2
Fiziksel durumu	Katı
Suda çözünebilir	30^oC'de 20,000 ppm

ETU, tiroidi hedef alan bir kimyasaldır. Sıçan, fare ve köpeklerle yapılan subkronik ve kronik çalışmalarda ETU maruziyetinin bir sonucu olarak tiroid toksisitesi belirtilmiştir. Bir kronik köpek çalışmasında aşırı karaciğer toksisitesi gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan çalışmada hidrosefali ve ilişkili lezyonları, iskelet sistemi kusurlarını ve diğer kaba kusurları içeren gelişimsel bozukluklar görülmüştür. Bu defektler, yalnızca anne yemek tüketiminde ve vücut ağırlığında kilo alımında azalmaya neden olan bir dozda meydana geldiği için fetuslarda duyarlılığı arttırdığını göstermiştir (EPA 2005).

Dişi sıçanlarla yapılan akut besleme çalışmasında ETU için NOEL=5 mg/kg/gün ve LOEL=10 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Köpeklerle yapılan kronik besleme çalışmasında ise NOEL=0.18 mg/kg/gün, LOEL=1.99 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. İnsanlar için kısa dönem ETU'ya maruz kalındığında NOEL=5 mg/kg/gün, uzun dönem maruz kalındığında NOEL=0.18 mg/kg/gün olarak bulunmuştur (EPA 2005).

2.6.4.3. Metiramın kanserojen etkisi

Charles vd. (2000) metiramın subkronik ve kronik toksisitesini ve kanserojen potansiyelini araştırmışlardır. Sıçanların diyetlerine 0, 5, 20, 80 ve 320 ppm metiram eklemişlerdir. Dişi farelere 89 hafta, erkek farelere ise 95 hafta 0, 100, 300 ve 1000 ppm diyetlerine metiram uygulanmıştır. İki türde de onkojenik bir yanıt olmamıştır. Tiroidin hedef organ olduğu görülmüştür. Sıçanlarda NOEL=80 ppm, farelerde NOEL=300 ppm olarak belirlenmiştir. Bu çalışma metiramın kemirgenlerde karsinojenik olmadığını göstermiştir.

2.6.4.4. Metiramın ekolojik etkileri

Karasal türler için kısa vadeli veya akut metiram riskleri, memelilere, kuşlara ve hedef dışı böceklere karşı düşük olarak belirlenmiştir (EPA 2005).

2.6.4.5. Metiramın bitki üzerinde kalıntı miktarları

Pestisit kullanımının olumsuz yanlarından biri de pestisitlerin veya metabolitlerinin tarım ürünleri üzerinde uzun süre kalabilmesidir. Bu şekilde insanlarda ve bu yemlerle beslediğimiz hayvanlarda toksik etkiler görülebilmektedir.

Metiramın son ilaçlama ile hasat arasındaki tavsiye edilen minimum süre domateste ve tütünde 7 gün, elmada 21 gün, turunçgillerde 28 gün, bağda ise 56 gündür (BKU 2019d). Bu sürenin uzun olması tarım ürünlerinde ve bunlardan üretilen şarap gibi içeceklerde pestisit kalıntısı bulunma ihtimalini artırmaktadır.

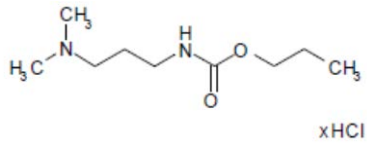
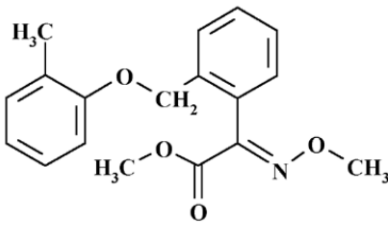
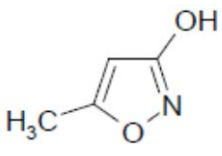
3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada tarımda kullanılan Propamocarb hydrochloride, Kresoxim methyl, Hymexazol ve Metiram fungisitlerinin genotoksikolojik etkilerini saptamak için *D. melanogaster* hatlarında (*mwh* ve *flr*^{3}) kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. Bu test sisteminde, markır genler bakımından transheterozigot larvalar farklı derişimlerde etken madde içeren *Drosophila* hazır besini ile 48 saat boyunca kronik olarak beslenmiştir. SMAR testinin prensibi heterozigotluğun kaybolması esasına dayanmaktadır. Maruziyet sonucunda kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan delesyon, nokta mutasyonu ve ayrılmama gibi genetik değişimler sonucu kaybolan heterozigotluk nedeni ile farklı fenotipler gözlenebilmektedir (Graf vd. 1984, Kaya 2000).

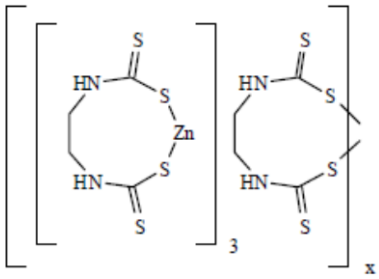
3.1. Uygulanan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan fungisit aktif maddeleri ülkemizdeki farklı ilaç firmalarından temin edilmiştir. Fungisitlerle ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Propamocarb hydrochloride sıvı, diğer kullanılan fungisitler katı formdadır. Uygulamadan hemen önce taze olarak hazırlanan derişimler aktif maddelerin distile su içerisinde seyreltilmesi ile yapılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubunda ise genotoksik etkisi bilinen EMS (etil metansülfonat) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada genotoksik etkisi araştırılan fungisitlerle ilgili bilgiler

Fungisitler	**Saflık Oranı**	**CAS Numarası**	**Moleküler Ağırlık**	**Molekül Formülü**
Propamocarb Hydrochloride 	%90	25606-41-1	224.7	$C_9H_{21}ClN_2O_2$
Kresoxim methyl 	%96	143390-89-0	313.8	$C_{18}H_{19}NO_4$
Hymexazol 	%97	10004-44-1	99.15	$C_4H_5NO_2$

Çizelge 3.1'in devamı

Fungisitler	**Saflık Oranı**	**CAS Numarası**	**Moleküler Ağırlık**	**Molekül Formülü**
Metiram 	%85	9006-42-2	1088.6	$C_{16}H_{33}N_{11}S_{16}Zn_3$

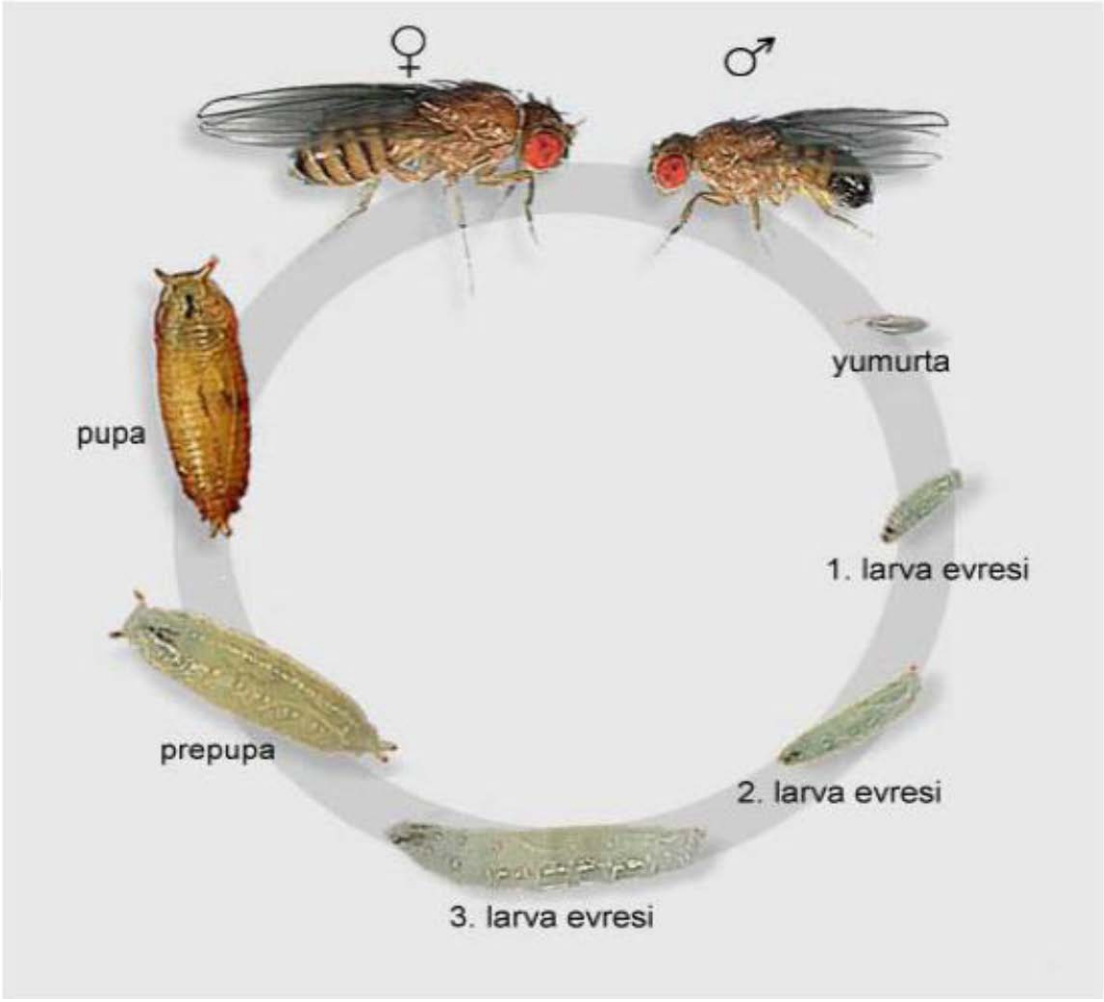
3.2. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Meyve sineği veya sirke sineği olarak adlandırılan *D. melanogaster*, genetik çalışmalarda model organizma olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. *D. melanogaster*, Insecta sınıfı Diptera takımından tam başkalaşım (holometabol) gösteren bir omurgasız hayvandır. Mendel'in çalışmalarının yeniden keşfinden hemen sonra Amerika'da T. H. Morgan'ın laboratuvarında küçük boyutu, kültür kolaylığı, kısa jenerasyon süresi, çok yavru vermesi, kromozom sayısının azlığı ve farklı çalışmalarda avantaj sağlayan dev kromozomlarının bulunması gibi nedenlerle genetik çalışmalar için ideal bir deney hayvanı olarak kabul edilmiştir (Graf vd. 1992).

Kromozom sayısı 2n=8'dir. 25^{o}C ve %60 nem oranında olgunlaşma süresi 9-11 gündür ve gelişim evreleri aşağıdaki gibidir (Graf vd. 1992).

"Embriyonik gelişim : 1 gün
Birinci larval evre (L1) : 1 gün
İkinci larval evre (L2) : 1 gün
Üçüncü larval evre (L3): 2 gün
Prepupa evresi : 4 saat
Pupa evresi : 4.5 gün
Yetişkin evresi : 40-50 gün"

Gelişim evrelerinin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir.

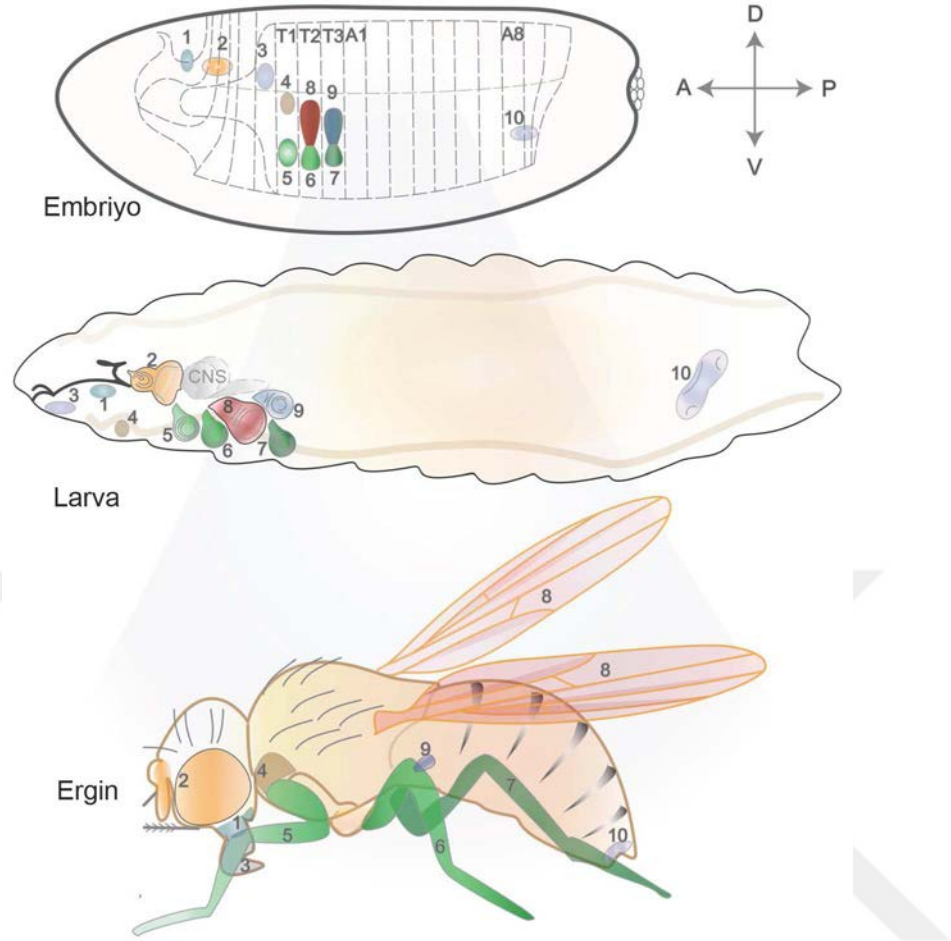


Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü (Kasımoğlu 2016)

Drosophila'nın erkek bireyleri pupadan çıktıklarında eşeysel olgunluğa erişmiş durumdayken dişiler eşeysel olgunluğa pupadan çıktıktan 6-12 saat sonra ulaşmaktadır (Graf vd. 1992). Çalışmada döllenmemiş (virjin) dişi flr^3 bireyler pupadan çıktıktan en fazla 4 saat sonra seçilerek döllenmemiş olmaları garanti altına alınmıştır.

25^{o}C'de yaşam süreleri 40-50 gün olmasına rağmen, 80 gün kadar yaşayan bireyler de olmaktadır. Yaşla birlikte üreme azaldığından normalde 10 günden daha yaşlı bireyler çaprazlamada kullanılmazlar (Graf vd. 1992).

Larvada epidermal yapıları oluşturacak 9 bilateral çift ve ortada 1 genital disk olmak üzere toplam 19 imajinal disk vardır. Her torasik segment ayrıca humeral (veya dorsal prothorasik), kanat ve halter diskler olarak adlandırılan bir çift dorsal imajinal disk oluşturur. Embriyoda her imajinal disk çok az hücrenin kümelenmesiyle oluşur. Morfoloji larva evresinde olgunlaşır (Beira 2016). Şekil 3.2'de embriyo ve larva evresinde imajinal disklerin yerleri ve bu imajinal disklerin erginde hangi yapıları oluşturduğu gösterilmiştir.

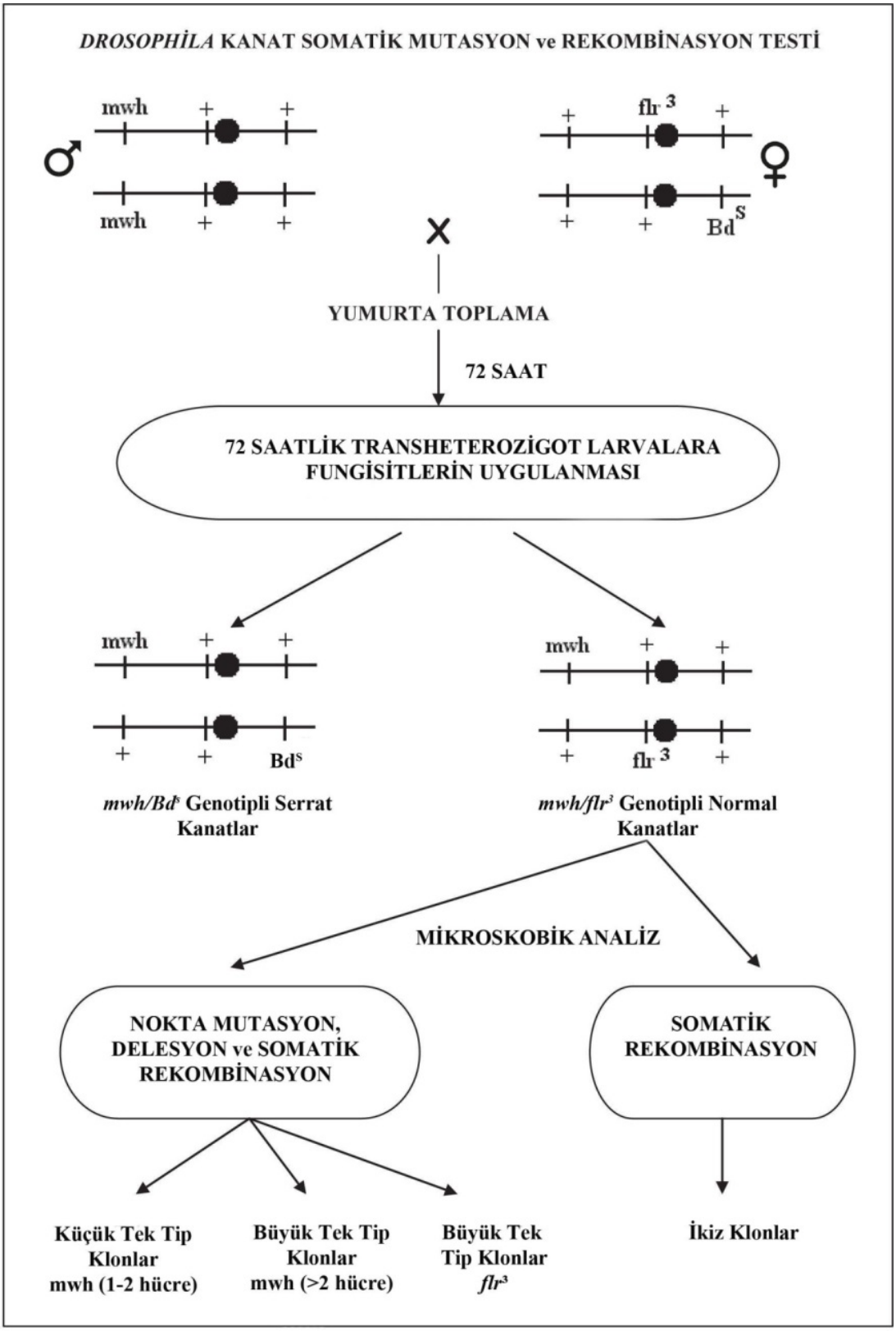


Şekil 3.2. *Drosophila melanogaster*'de imajinal diskler, embriyonik primordiyaları ve ergin kütikular ürünleri (Beira 2016) (A anterior, P posterior, D dorsal, V ventral) T1-T3 toraks segmentlerini, A1-A8 abdomimal segmentleri göstermektedir

3.3. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, larval dönemde yapılan uygulamanın sonucunda kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelen nokta mutasyonu, delesyon ve kromozomlarda ayrılmamanın kanatlarda fenotipik olarak görülmesine dayanan *in vivo* bir genotoksisite testidir. Uygulama yapılan transheterozigot larvalarda mutasyonlar ile heterozigotluk kaybolarak mutant marker genin fenotipte ifadesi gözlenir (Graf vd. 1984). Kısaca test, prensip olarak farklı etmenlerin etkisiyle transheterozigot larvalarda heterozigotluğun kaybolması ile farklı fenotiplerin gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Şekil 3.3'de *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi şematik olarak özetlenmiştir. Çalışmada *mwh*/*mwh* ve flr^3/*TM3*, Bd^s genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 72±4 saatlik transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Yapılan çaprazlama aşağıdaki gibidir:

♀ flr^3/*TM3*, Bd^S X ♂ *mwh*/*mwh*



Şekil 3.3. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterilmesi (Demir 2011)

Besin içeren şişelere 40 tane virgin *flr* dişi birey ve 40 tane genç *mwh* erkek birey konulmuştur. Bu bireyler aynı ortamda en az 1 gün tutularak çiftleşmeleri sağlanmıştır. Bireyler daha sonra besin içeren yeni şişelere aktarılmış ve 8 saat boyunca besi ortamına yumurtlamaları beklenmiştir. Daha sonra bireyler başka şişelere aktarılmıştır. 8 saatlik yumurta toplama işleminde amaç aynı larval evredeki bireylerin elde edilmesidir. 72±4 saat sonra 3. larval evreye ulaşan bireyler musluk suyu altında ince gözenekli elekler yardımıyla ayrılmıştır. Elek yardımı ile toplanan 3. evre larvalar, taze hazırlanmış çalışılacak fungisit derişimlerinden 9 ml eklenerek ıslatılmış olan *Drosophila* hazır besini içeren plastik şişelere aktarılmıştır. Her bir uygulama ortamına, 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) larva konulmuştur.

Uygulama ortamında fungisitlere kronik olarak maruz bırakılan bireylerin erginleşmesi beklenmiştir. Ergin bireyler kanat preparatları hazırlanıncaya kadar %70'lik etanolde +4 ^{o}C'de saklanmıştır. Kanat preparatları hazırlanırken normal kanatlı bireyler seçilmiştir. Hazırlanan preparatlardaki klonlar mikroskopta sayılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

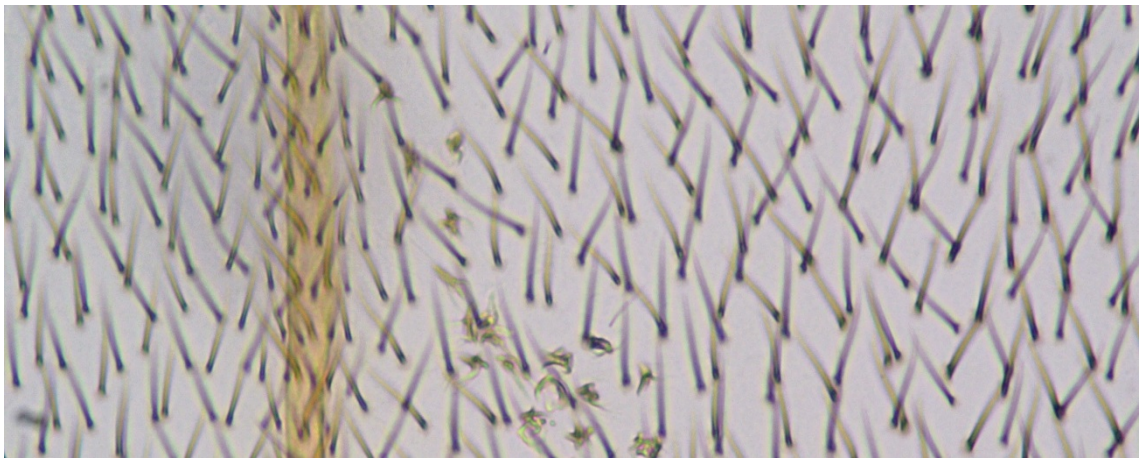
3.4. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Kullanılan hatların genetik yapısı şu şekildedir (Kaya 2000):

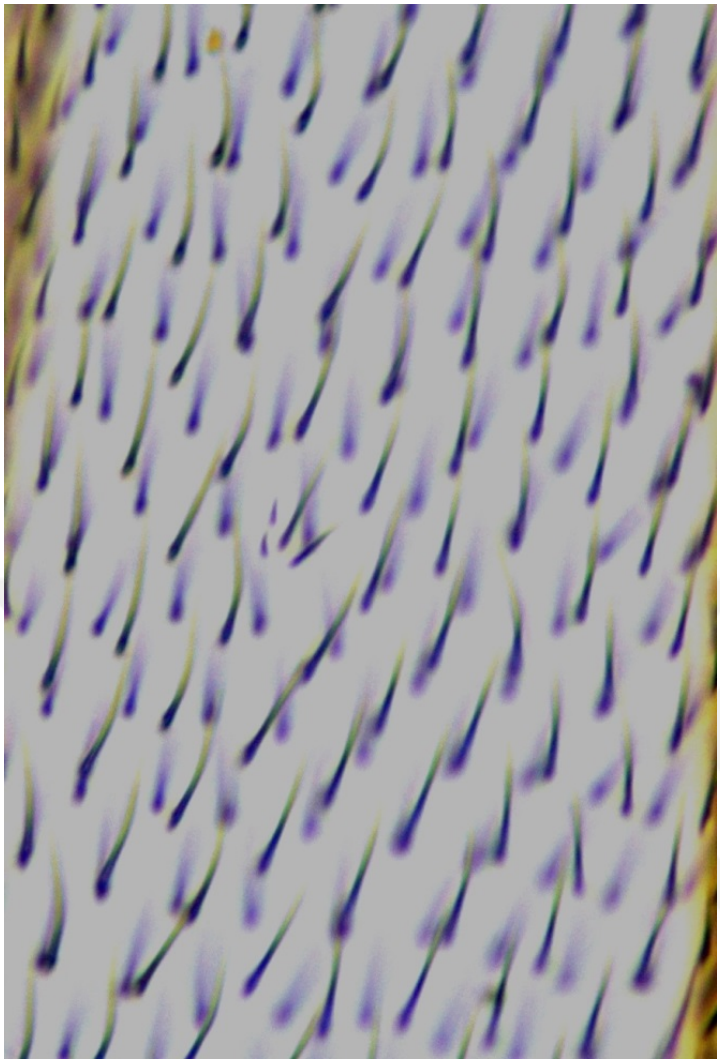
♂ ***mwh/mwh***: Erkek bireyler 3.kromozomlarında homozigot *mwh (multiple wing hair*) (3-0.3) genleri taşırlar.

♀ ***flr^{3}/TM3, Bd^{S}:*** Dişi bireyler ise 3.kromozomlarında *fl^{3}(flare)*(3-38.8) ve *TM3, Bd^{S}* (3-91.9) genleri taşırlar.

fl^{3} geni kanat üzerindeki kılların alev şeklinde veya şekilsiz olmasını sağlar (Şekil 3.4). *mwh* geni ise aynı hücreden bir yerine üç veya daha fazla kıl çıkmasına neden olur (Şekil 3.5).

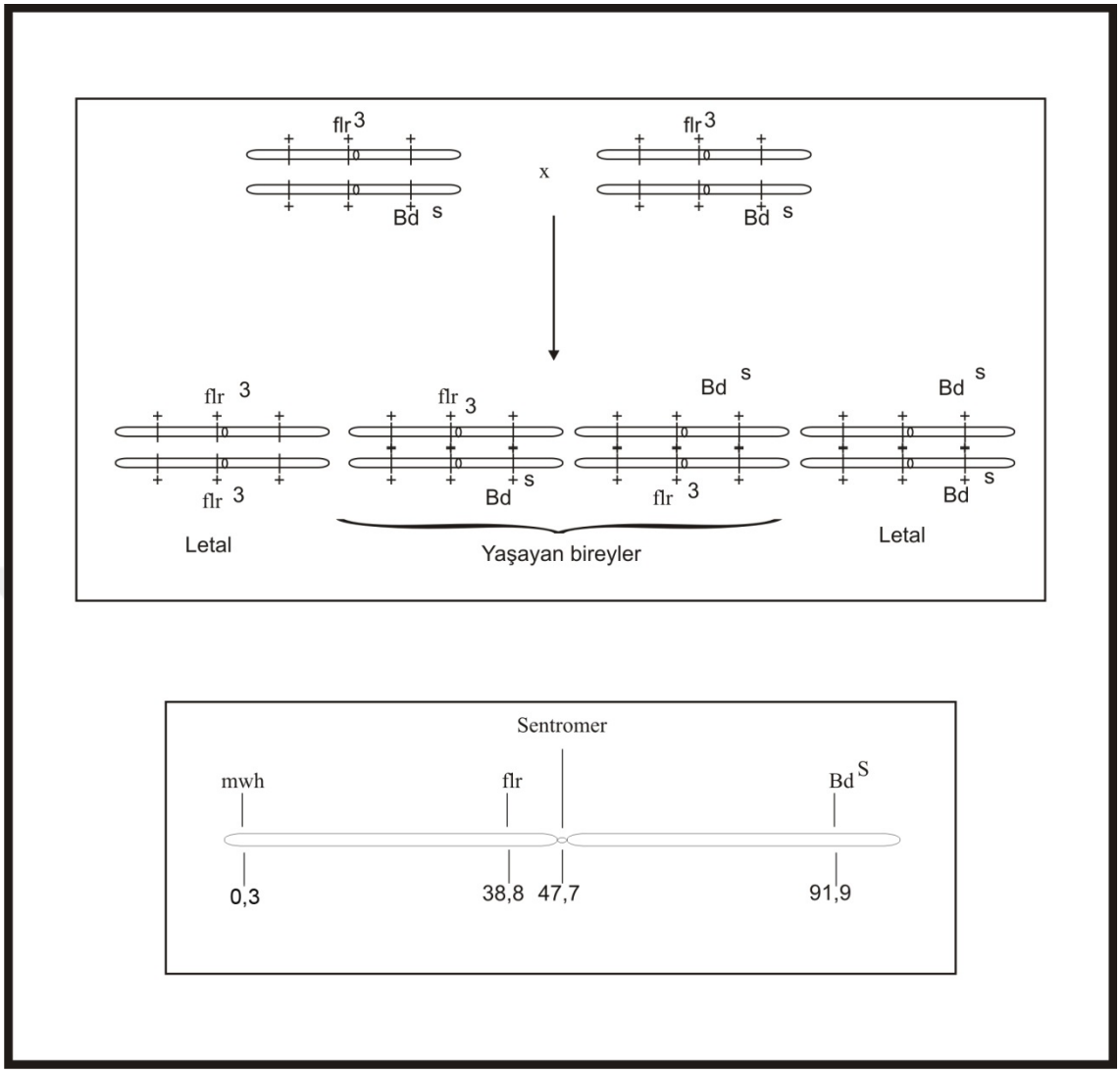


Şekil 3.4. *flr* örnekleri (Orijinal)



Şekil 3.5. *mwh* örneği (Orijinal)

flr^{3} ve *Bd*^{s} geni homozigot durumda embriyonik evrede letal etkiye sahiptir (Şekil 3.6). Eğer homolog kromozomların birinde *flr*^{3} geni varken diğerinde *TM3, Bd*^{s} geni varsa letal etki gözlenmemektedir. *TM3* geni dengeleyici olarak kullanılarak letal etkiyi önlemektedir. *TM3* geni aynı zamanda 3. kromozomda meydana gelecek olan rekombinasyonları da baskılamaktadır. Bu genotipteki bireyler *Bd*^{s} geninden dolayı serrat kanat şekline sahip oldukları için *mwh/flr*^{3} genotipindeki bireylerden fenotipik olarak kolayca ayrılmaktadırlar (Şekil 3.7) (Kaya 2000, Kasımoğlu 2016).



Şekil 3.6. Çaprazlamadaki letal etkiler ve genlerin 3.kromozom üzerindeki yerleri (Kaya 2000, Demir 2011)



Şekil 3.7. Serrat kanat (Kasımoğlu 2016)

3.5. *Drosophila* Hatlarının Kültürü

Drosophila kültürleri iklim odasında 25^{o}C ve %60 nem ortamında, 200 ml'lik cam şişelerde standart besin ortamında kültüre alınmıştır. Standart besin içeriğinde mısır unu (104 g), şeker (94 g), ekmek mayası (19 g), agar (5-6 g), asit karışımı (6 ml) ve distile su (1020 ml) bulunmaktadır. 250 ml asit karışımında 209 ml propiyonik asit, 20,75 ml ortofosforik asit ve 27 ml distile su bulunmaktadır. Asit karışımı kültürde fungus üremesini engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi şişelere 1-1,5 cm standart besin döküldükten sonra ağızları önce kurutma kâğıdı, ıslaklık gittikten sonra ise süngerle kapatılmaktadır. Besin 1-2 gün içinde kuruduktan sonra şişelere *Drosophila* örnekleri aktarılabilmektedir (Kaya 2000).



Şekil 3.8. *Drosophila* kültür şişeleri (Orijinal)

3.6. Çaprazlama İçin Birey Seçimi

Çalışmada *mwh*/*mwh* erkek ve *flr*^{3}/*TM3, Bd*^{s} dişi genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 72±4 saatlik transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Kültürden bireyler seçilirken dişiler eşeysel olgunluğa ulaşmadan virgin halde seçim yapabilmek için 4'er saat aralıklarla erkek ve dişi birey seçimi yapılmıştır. Bireyler seçilirken bayıltmak için eter kullanılmıştır. Seçilen bireyler besin içeren şişelere 40 tane virgin *flr* dişi birey ve 40 tane genç *mwh* erkek birey olacak şekilde konulmuştur. Bu bireyler aynı ortamda en az bir gün tutularak çiftleşmeleri sağlanmıştır. Daha sonra dişi bireyler yumurtlamaları için yeni besin ortamına alınmış ve 8 saat boyunca yumurtlamaları beklenmiştir. Larvaların birbirine yakın evrede olabilmeleri için dişiler her 8 saatte bir yeni besin ortamına alınmışlardır ve yine 8 saat burada yumurtlamaları beklenmiştir. Bu şekilde aynı şişedeki larvaların gelişim dönemlerinin birbirine yakın olması sağlanmıştır. 72±4 saat sonra şişelerdeki 3.larval evrede olan örnekler uygulamaların yapıldığı besi ortamına bırakılmıştır. Uygulamanın 3.larval evredeki bireylerle yapılmasının nedeni somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için en ideal zaman olarak bu evrenin belirlenmesindendir. Graf (1995) çalışmasında mutajeni farklı evredeki larvalara uygulamış, genç larvalarda az sayıda ve geniş klonların oluştuğunu, daha yaşlı larvalarda daha küçük ve daha çok klon oluştuğunu gözlemlemiştir. Bu iki dönem larvalarda ikiz klon gözlenmemiştir, bu yüzden kanat somatik mutasyon testi için en uygun evrenin üçüncü larval evre olduğuna karar verilmiştir.

3.7. Fungisitlerin Uygulanması

Deney gruplarına propamocarb hydrochloride, kresoxim methyl, hymexazol ve metiram fungisitleri 1, 2, 5 ve 10 mM olmak üzere dört dozda uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan fungisitlerle ilgili bilgiler önceki sayfalarda Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Negatif kontrol olarak, çalışılan her bir fungisitin çözüldüğü distile su, pozitif kontrol olarak ise genotoksik olduğu bilinen EMS (etil metansülfonat)'nin 1 mM lık dozu kullanılmıştır (Şekil 3.9). Deney sırasında kuru halde bulunan ve tüplere yaklaşık 4,5 gram konulan *Drosophila* hazır besini (*Drosophila* Instant Medium), hazırlanan fungisit derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatılmıştır. Her derişim için 3 deney tüpü hazırlanmıştır. 8 saat yumurta toplama işleminden sonra 3. larval evrenin başlangıcındaki 72±4 saatlik larvalar musluk suyu altında elek yardımıyla toplanıp fungisitli besin içeren tüplere konulmuş ve tüplerin ağızları süngerle kapatılmıştır (Şekil 3.9). Uygulama yapılan larvalar inkübatörde 25^{o}C'de, pupa evresine geçinceye kadar 48 saat boyunca, kronik olarak fungisit eklenmiş besinlerle beslenmişlerdir. Pupa evresinden sonra çıkan ergin bireyler toplanarak kanat preparatları hazırlanıncaya kadar %70'lik etil alkolde +4^{o}C'deki buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.9. *Drosophila* hazır besini içeren deney tüpleri (Orijinal)

3.8. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Kanat preparatları hazırlanırken buzdolabında +4^{o}C de %70'lik etil alkolde saklanan örneklerden normal kanat şekline sahip bireyler seçilmiştir. Stereo mikroskop altında seçilen normal kanatlı bireyler petri kabında bulunan distile su içerisine alınmıştır. Daha sonra çukur lama faure çözeltisi damlatılmış, alınan bir örneğin kanatları sırasıyla koparılmış, faure solüsyonuna batırılarak çiftler halinde lama yapıştırılmıştır. Kanatlar koparılırken ve yapıştırılırken diseksiyon iğnesi ve ince uçlu pens kullanılmış, trikomlara zarar vermemeye dikkat edilmiştir. Her lamda 24 bireyden elde edilmiş olan toplam 48 kanat vardır ve her derişim için iki preparat hazırlanmıştır (Şekil 3.10).

Faure solüsyonunda gum arabic (30 g), gliserol (20 ml), kloral hidrat (50 g) ve distile su (50 ml) bulunmaktadır (Kaya 2000). Hazırlanan preparatlar 24 saat boyunca

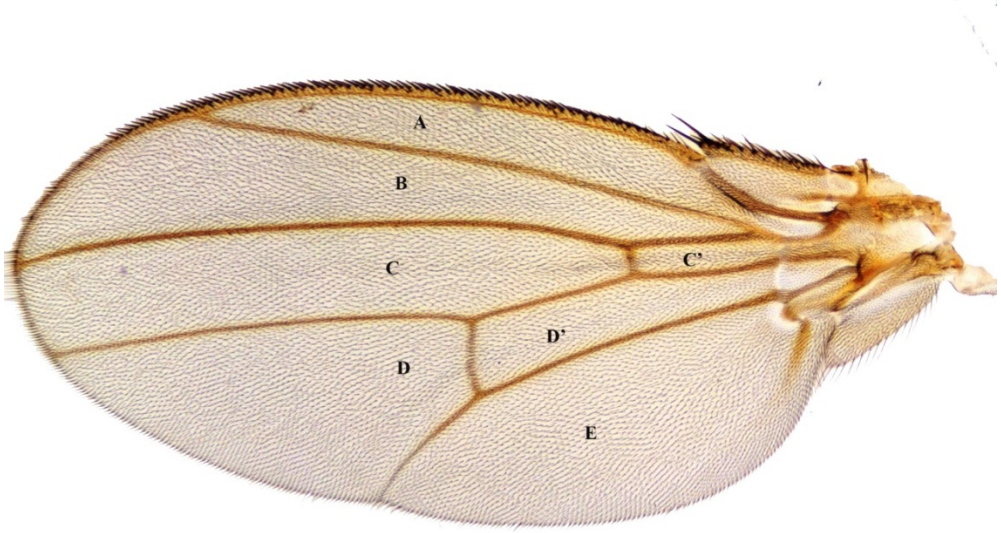
tozsuz bir ortamda petri kabında kuruduktan sonra üzerlerine faure solüsyonu damlatılarak içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde 24x60 mm'lik lamellerle kapatılmıştır. Taşan solüsyon temizlendikten sonra preparatların üzerine 30-40 g ağırlığında metal bloklar konularak 2 gün boyunca kanatların düzleşmesi ve faure solüsyonunun kuruması için bekletilmiştir. 2 gün sonunda hazır hale gelen preparatlar sayım aşamasına kadar preparat kutularına alınmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Hazırlanan preparat örneği (Orijinal)

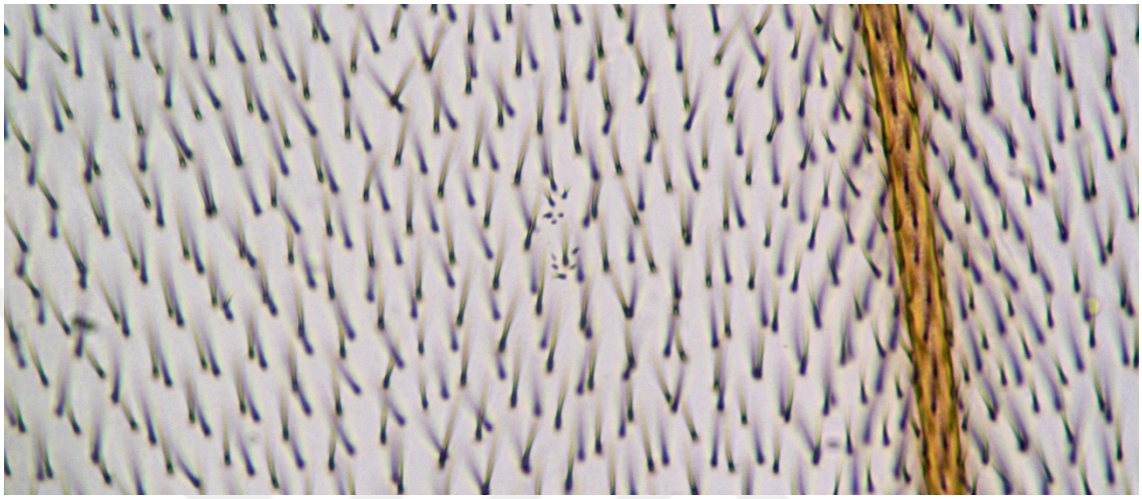
3.9. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi

Hazırlanan kanat preparatları ışık mikroskobunda 10x40 büyütmede incelenerek gözlenen *mwh* ve *flare* trikomlar görüldüğü sektörle birlikte not edilmiştir. Çalışılan her bir fungisit dozu için 80 kanat sayılmıştır. Kayıtlar Şekil 3.11'de gösterildiği gibi kanat üzerindeki sektörler dikkate alınarak yapılmıştır. Bu şekilde kayıt yapılması tekrar kontrollerinin kolay olmasını sağlar.

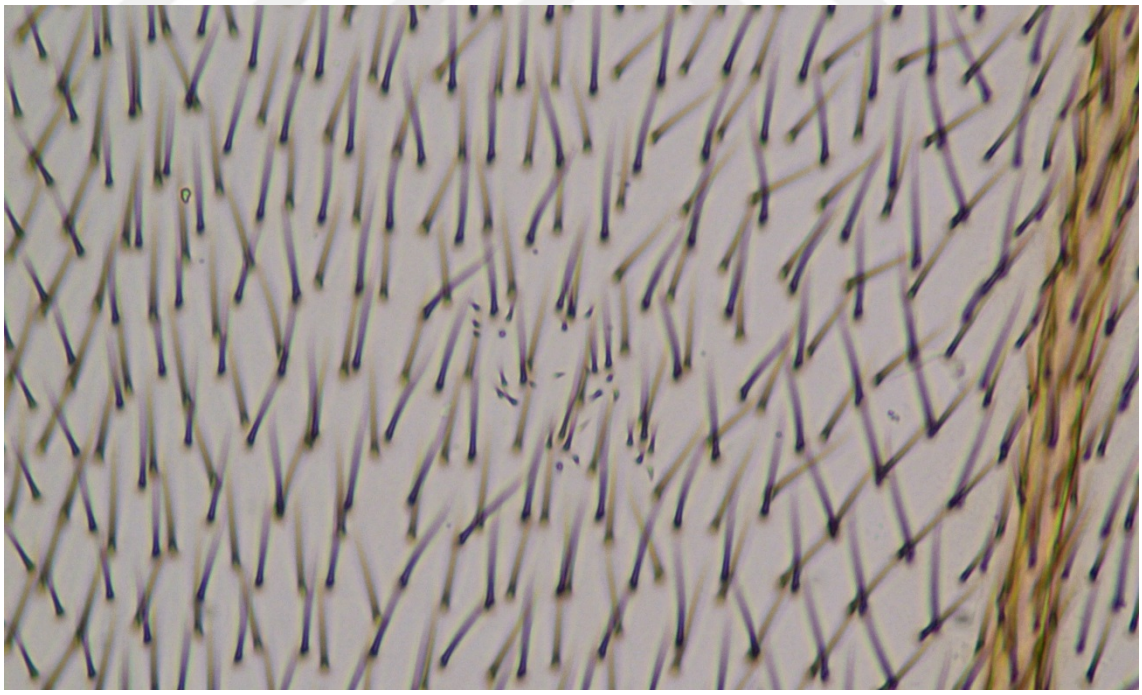


Şekil 3.11. Kanat üzerindeki sektörler (10x10)(Orijinal)

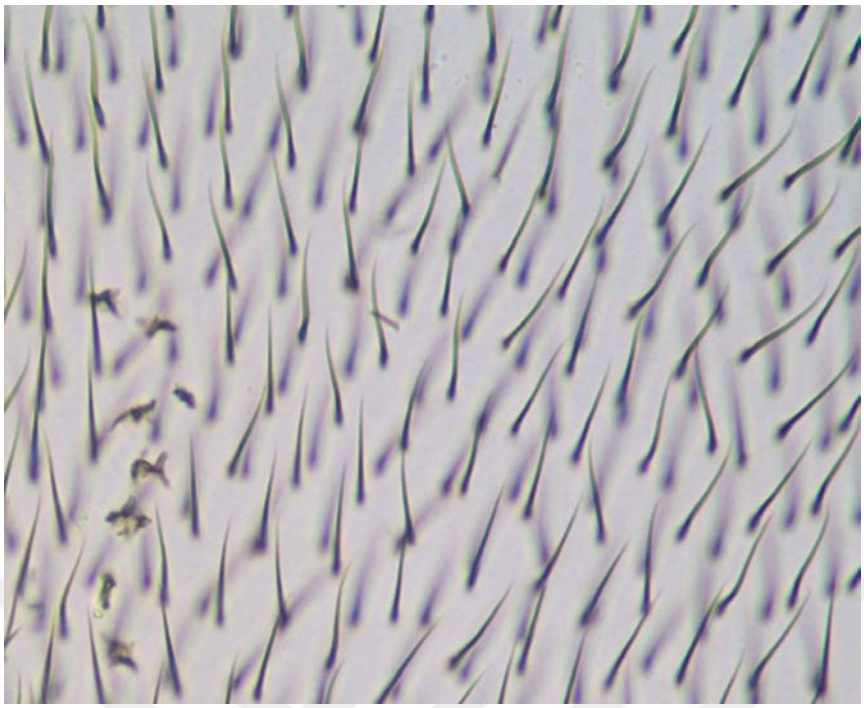
Sayımdaki kayıtlar değerlendirilirken klonlar, küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)(Şekil 3.12), büyük tek tip klon (>3 *mwh* veya *flr* hücre)(Şekil 3.13 ve Şekil 3.14) ve ikiz klon (hem *mwh* hem *flr* bulunduran klonlar)(Şekil 3.15) olarak ayrılmıştır. Yalnız bulunan *flr* trikomların sayısı 4'ten az ise varyasyon sonucunda da olabildiği için değerlendirmeye dahil edilmemiştir (Graf vd. 1984). İki farklı klon arasında 3 ve 3'ten fazla normal trikom varsa ayrı klonlar olarak, 3'ten az trikom varsa aynı klon içerisinde değerlendirilmiştir (Graf vd. 1984, Kaya 2000).



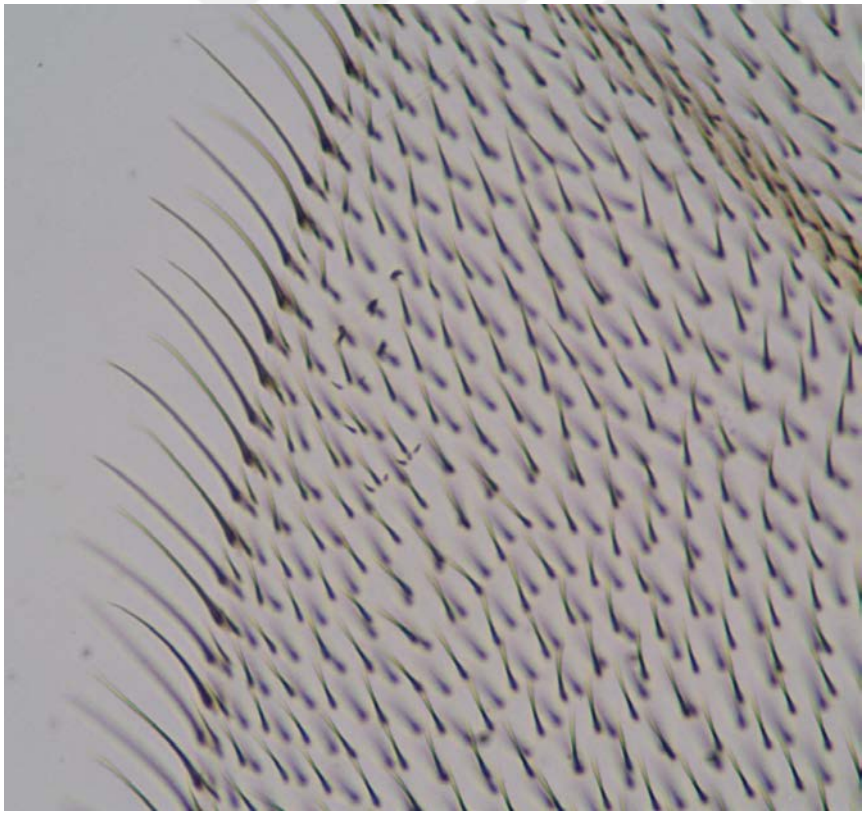
Şekil 3.12. Küçük tek tip klon (Orijinal)



Şekil 3.13. Büyük tek tip *mwh* klon (Orijinal)

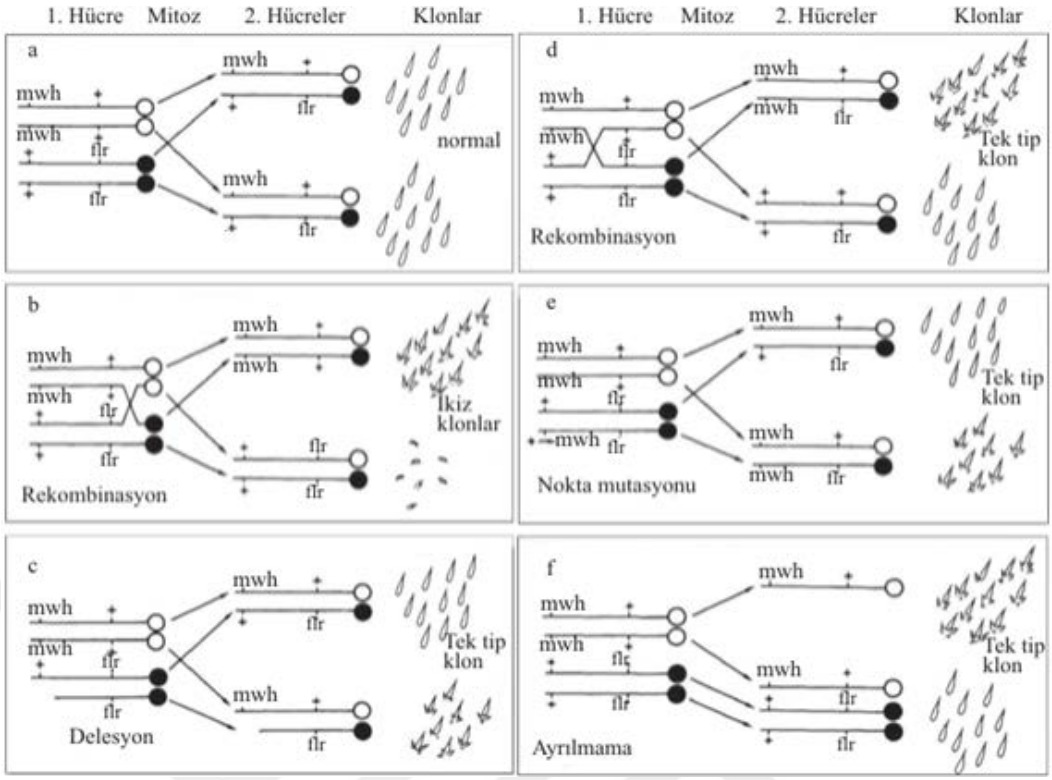


Şekil 3.14. Büyük tek tip *flr* klon (Orijinal)



Şekil 3.15. İkiz klon (Orijinal)

Çalışmadaki *mwh/flr*^{3} genotipindeki bireylerde görülebilecek klon tipleri ve hangi değişiklikleri ifade ettiği Şekil 3.16'da verilmiştir (Graf vd.1984).



Şekil 3.16. *mwh/flr*^{3} genotipindeki bireylerde görülebilecek klon tipleri ve ifade ettiği değişiklikler (Graf vd 1984)

3.10. Klon İndüksiyon Frekansı ve Rekombinasyon Frekansının Hesaplanması

Klon indüksiyon frekansının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmaktadır (Frei ve Würgler 1988).

$$f = \frac{n}{NxC} \times 10^5$$

f= *mwh* klonların indüksiyonlarının ortalama frekansı

n= Gözlenen toplam *mwh* klon sayısı

N= İncelenen kanat sayısı

C= Bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısı (24 400)

Garcia-Bellido ve Merriam (1971)'e göre bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısı 24 400'dür (Kaya 2000).

3.11. Verilerin Değerlendirilmesi

Mikroskopta yapılan sayımlar sonucu elde edilen veriler, *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin istatistiksel analizi için yapılan bilgisayar programı MICROSTA ile değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmede Frei ve Würgler

(1988)'deki istatistiksel yöntem kullanılmıştır. Hipotezler şartlı binomial test ve Khi kare (X^2) ile test edilmiştir. Orijinal (null) hipotez (H_0) ve alternatif hipotez (H_A) olmak üzere iki farklı hipotez kurulmuştur:

H_0= Deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark yoktur.

H_A= Deney grubundaki indüklenen mutasyon oranı kontrol grubundan m kat daha fazladır.

Hesaplanan P_0 ve P_A değerlerine göre hipotezler 0.05 anlamlılık düzeyinde kabul veya red edilir. H_A hipotezlerini test etmek için büyük tek tip ve ikiz klonlarda m katsayısı 5, küçük tek tip ve toplam klonlarda ise 2 alınmıştır. Çünkü büyük tek tip ve ikiz klonların spontan olarak görülme oranı daha düşükken küçük tek tip klonların spontan olarak gözlenme oranı daha yüksektir (Graf vd.1984). H_0 ve H_A hipotezlerinin kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.2 kullanılarak sonuca ulaşılır. Her iki hipotez de kabul edilirse sonuç önemsiz (i), her iki hipotez de reddedilirse sonuç zayıf pozitif (z), H_0 kabul edilirken H_A reddedilirse sonuç negatif (-), H_0 reddedilirken H_A kabul edilirse sonuç pozitif (+) olarak değerlendirilir.

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		**H_A**	
		KABUL	**RED**
H_0	**KABUL**	ÖNEMSİZ	NEGATİF
	RED	POZİTİF	ZAYIF POZİTİF

4. BULGULAR

Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in özgün markır genleri taşıyan (*multiple wing hair* ve *flare*) 72±4 saatlik larvaları 48 saat boyunca Propamocarb hydrochloride, Kresoxim methyl, Hymexazol ve Metiram fungisitlerinin belli dozlarına kronik olarak maruz bırakılarak genotoksik etkileri *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile incelenmiştir. Çaprazlama sonucunda normal ve serrat olmak üzere iki farklı kanat fenotipinde bireyler çıkmaktadır. Bu çalışmada genotoksik potansiyel değerlendirilmesi amaçlandığı için normal kanatlı bireylerden kanat preparatı hazırlanmıştır.

4.1. Negatif ve Pozitif Kontrol Grupları

Uygulamadan önce dozlar hazırlanırken çalışılan fungisitler distile su içerisinde çözündüğünden negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır. Hazırlanan preparatlarda 80 kanatta 25 küçük tek tip klon, 7 büyük tek tip klon görülmüş, ikiz klona rastlanmamıştır. Toplam *mwh* klon sayısı 32'dir. Elde edilen verilerden klon indüksiyon frekansı 1.64 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Akilleyici ajanlar sınıfında bulunan EMS (etil metansülfonat), mutajenik ve kanserojen bir maddedir. EMS'nin genotoksik potansiyelinden dolayı çalışmamızda pozitif kontrol olarak 1 mM EMS kullanılmıştır. Hazırlanan preparatlarda 80 kanatta 117 küçük tek tip klon, 49 büyük tek tip klon, 9 ikiz klon görülmüştür. Toplam *mwh* klon sayısı 171, toplam klon sayısı 175'tir. Klon indüksiyon frekansı ise 8.76 olarak hesaplanmıştır. EMS uygulamasının sonuçları negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çalışılan bütün kategorilerde (küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlarda) pozitif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

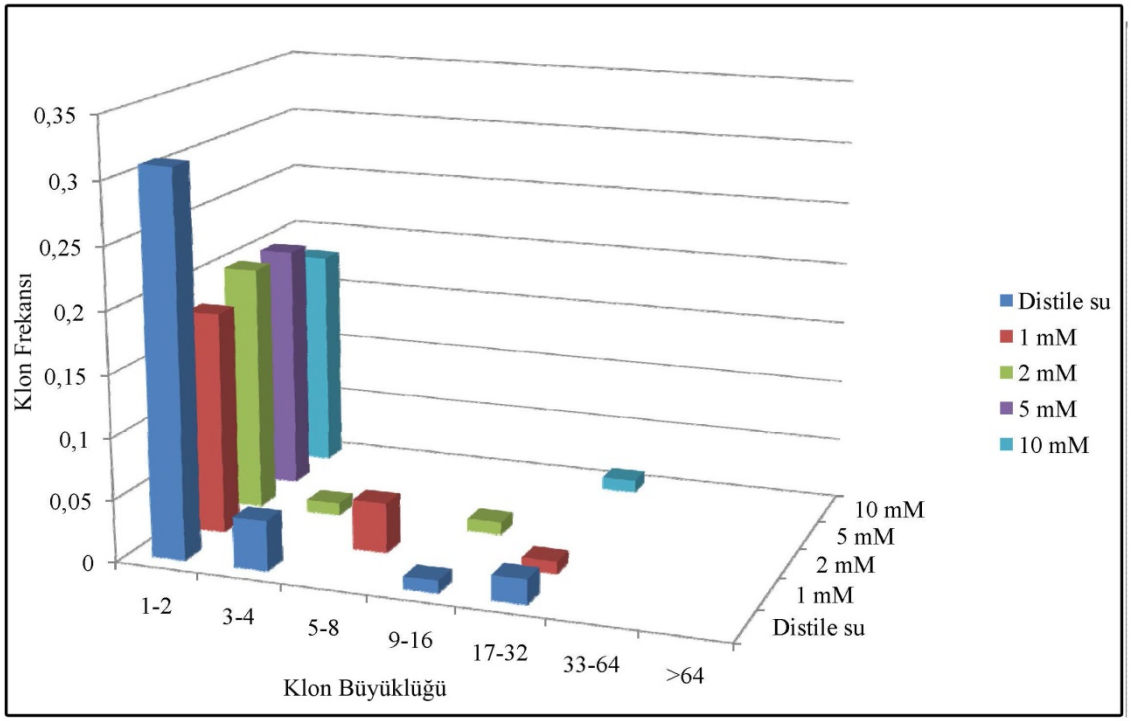
4.2. Propamocarb Hydrochloride

Propamocarb hydrochloride, distile suda çözülerek çalışılacak dozlar (1, 2, 5 ve 10 mM) hazırlanmıştır. Çalışmadan hemen önce taze olarak hazırlanan dozlar 72±4 saatlik transheterozigot larvalara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'te verilmiştir. Propamocarb hyrochloride'in uygulanan dozlarının klon indüksiyon frekansları 0.77 ile 0.92 arasında değişmektedir. Toplam klon sayısı ve toplam *mwh* klon sayısı negatif kontrol grubunda 32 iken deney gruplarında 15-18 arasında değişmektedir. Negatif kontrol grubunda ikiz klon gözlenmezken pozitif kontrol grubunda 9 tane, 10 mM'lık dozda ise 1 tane gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede propamocarb hyrochloride'in hiçbir dozunda genotoksik etki görülmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçlar klon frekansları bakımından grafik halinde Şekil 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Propamocarb hydrochloride'in *Drosophila melanogaster*'in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (*m*=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (*m*=5)			İkiz klonlar (*m*=5)			Toplam *mwh* klonları (*m*=2)			Toplam klonları (*m*=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat (*mwh/flr*^{3})																	
Distile su	80	25	(0.31)		7	(0.09)		0	(0.00)		32	(0.40)		32	(0.40)		1.64
1 mM EMS	80	117	(2.16)	+	49	(0.91)	+	9	(0.17)	+	171	(3.19)	+	175	(3.24)	+	8.76
1	80	14	(0.18)	-	4	(0.05)	-	0	(0.00)	-	18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
2	80	16	(0.20)	-	2	(0.03)	-	0	(0.00)	-	18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
5	80	16	(0.20)	-	0	(0.00)	-	0	(0.00)	-	16	(0.20)	-	16	(0.20)	-	0.82
10	80	14	(0.18)	-	0	(0.00)	-	1	(0.00)	i	15	(0.19)	-	15	(0.19)	-	0.77

Fr., frekans; D.,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.1. Propamocarb hydrochloride'in klon frekans dağılımı

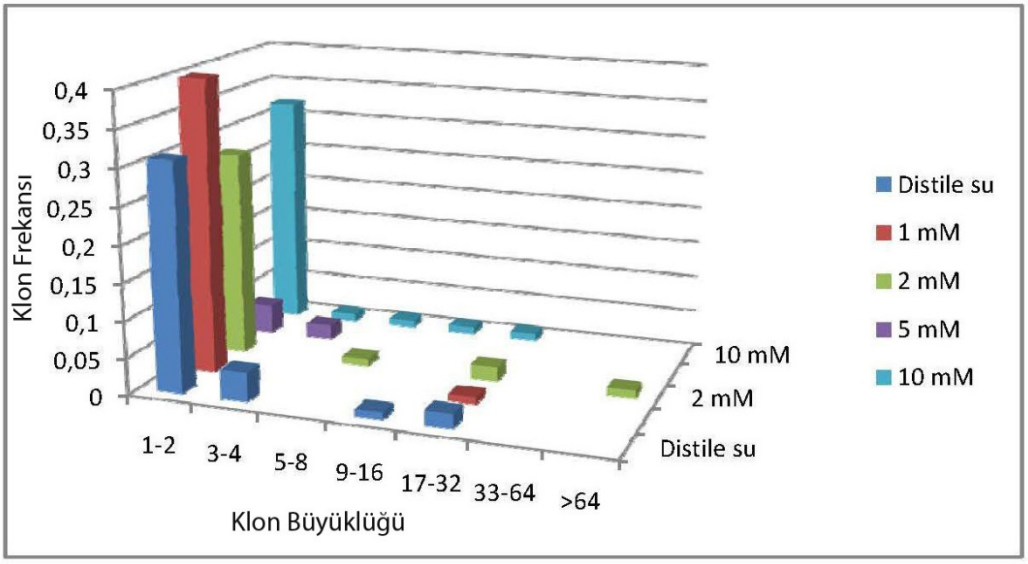
4.3. Kresoxim Methyl

Kresoxim methyl, distile suda çözülerek çalışılacak dozlar (1, 2, 5 ve 10 mM) hazırlanmıştır. Çalışmadan hemen önce taze olarak hazırlanan dozlar 72±4 saatlik transheterozigot larvalara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'te verilmiştir. Kresoxim methylin uygulanan dozlarının klon indüksiyon frekansları 1.28 ile 1.69 arasında değişmektedir. Toplam klon sayısı ve toplam *mwh* klon sayısı negatif kontrol grubunda 32 iken deney gruplarında 22-32 arasında değişmektedir. Negatif kontrol grubunda ikiz klon gözlenmezken pozitif kontrol grubunda 9 tane, 5 mM'lık hariç diğer dozlarda ise 1 tane gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede kresoxim methylin hiçbir dozunda genotoksik etki görülmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar klon frekansları bakımından grafik halinde Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Kresoxim methyl'in *Drosophila melanogaster*'in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (*m*=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (*m*=5)			İkiz klonlar (*m*=5)			Toplam *mwh* klonları (*m*=2)			Toplam klonları (*m*=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat (*mwh/flr*^{3})																	
Distile su	80	25	(0.31)		7	(0.09)		0	(0.00)		32	(0.40)		32	(0.40)		1.64
1 mM EMS	80	117	(2.16)	+	49	(0.91)	+	9	(0.17)	+	171	(3.19)	+	175	(3.24)	+	8.76
1	80	32	(0.40)	i	0	(0.00)	-	1	(0.01)	i	33	(0.41)	-	33	(0.41)	-	1.69
2	80	22	(0.28)	-	3	(0.04)	-	1	(0.01)	i	26	(0.32)	-	26	(0.32)	-	1.33
5	80	23	(0.29)	-	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	25	(0.31)	-	25	(0.31)	-	1.28
10	80	26	(0.32)	-	3	(0.04)	-	1	(0.01)	i	30	(0.38)	-	30	(0.38)	-	1.54

Fr., frekans; D.,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.2. Kresoxim methylin klon frekans dağılımı

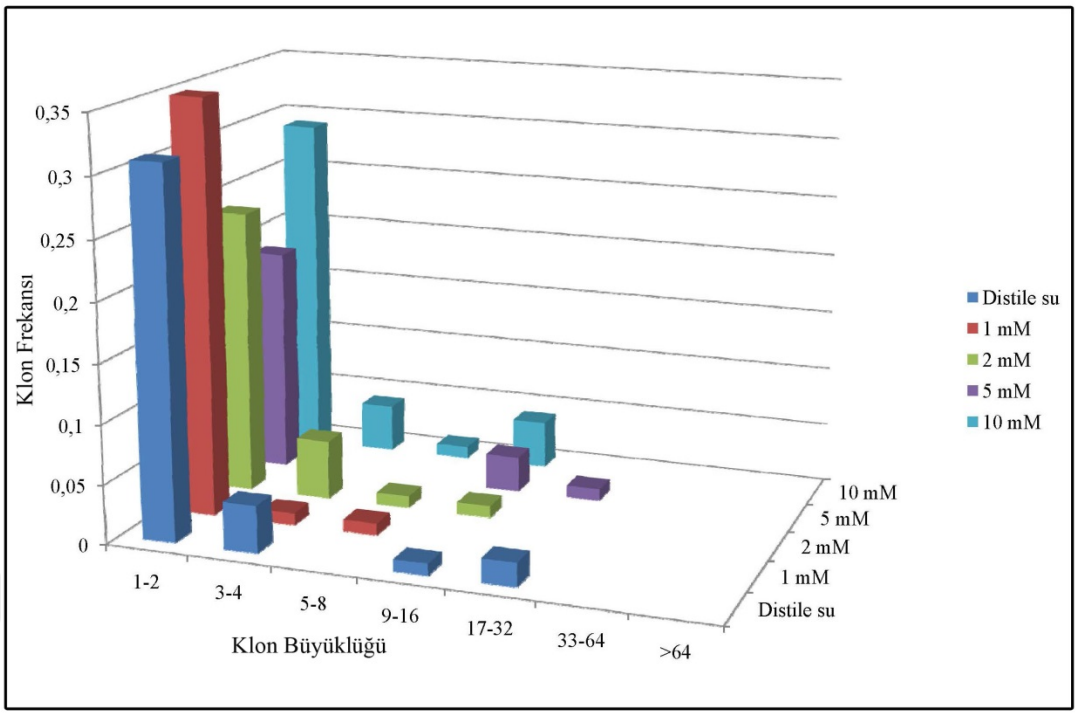
4.4. Hymexazol

Hymexazol, distile suda çözülerek çalışılacak dozlar (1, 2, 5 ve 10 mM) hazırlanmıştır. Çalışmadan hemen önce taze olarak hazırlanan dozlar 72±4 saatlik transheterozigot larvalara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Hymexazolün uygulanan dozlarının klon indüksiyon frekansları 0.92 ile 1.54 arasında değişmektedir. Toplam klon sayısı ve toplam *mwh* klon sayısı negatif kontrol grubunda 32 iken deney gruplarında 18-30 arasında değişmektedir. Negatif kontrol grubunda ikiz klon gözlenmezken pozitif kontrol grubunda 9 tane, 5 mM ve 10 mM'da 1 tane gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede hymexazolün hiçbir dozunda genotoksik etki görülmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.3). Elde edilen sonuçlar klon frekansları bakımından grafik halinde Şekil 4.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Hymexazolün *Drosophila melanogaster'*in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (*m*=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (*m*=5)			İkiz klonlar (*m*=5)			Toplam *mwh* klonları (*m*=2)			Toplam klonları (*m*=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat (*mwh/flr*^{3})																	
Distile su	80	25	(0.31)		7	(0.09)		0	(0.00)		32	(0.40)		32	(0.40)		1.64
1 mM EMS	80	117	(2.16)	+	49	(0.91)	+	9	(0.17)	+	171	(3.19)	+	175	(3.24)	+	8.76
1	80	28	(0.35)	-	2	(0.03)	-	0	(0.00)	-	30	(0.38)	-	30	(0.38)	-	1.54
2	80	19	(0.24)	-	6	(0.08)	-	0	(0.00)	-	25	(0.31)	-	25	(0.31)	-	1.28
5	80	15	(0.19)	-	2	(0.03)	-	1	(0.01)	i	18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
10	80	23	(0.29)	-	6	(0.08)	-	1	(0.01)	i	30	(0.38)	-	30	(0.38)	-	1.54

Fr., frekans; D.,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.3. Hymexazolün klon frekans dağılımı

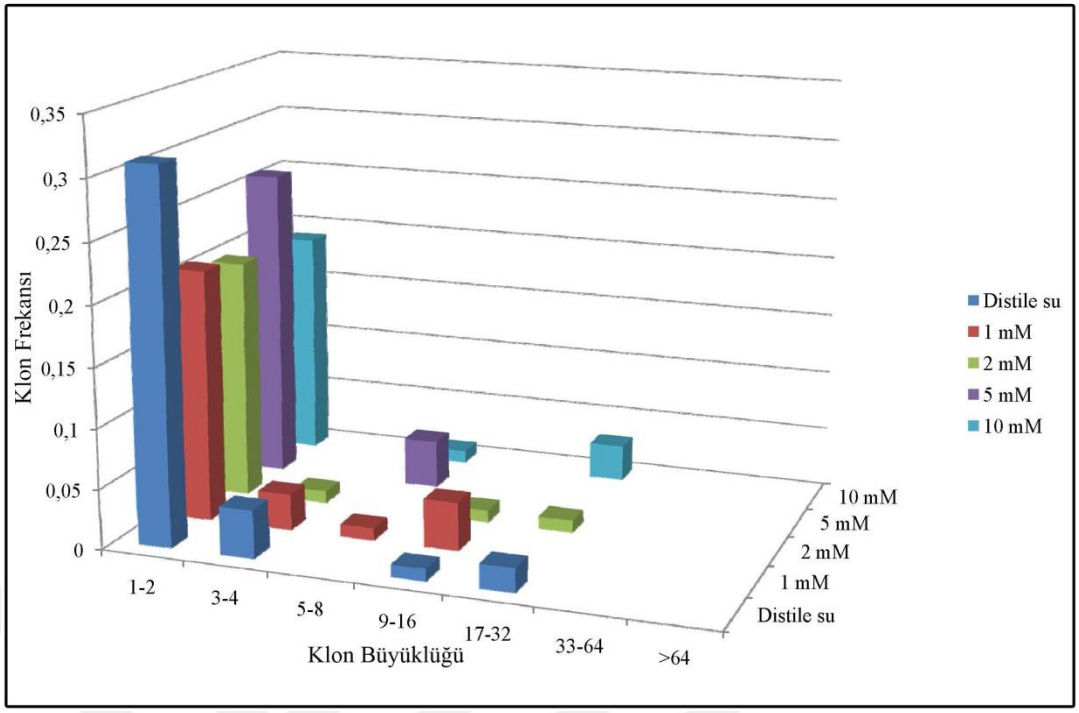
4.5. Metiram

Metiram, distile suda çözülerek çalışılacak dozlar (1, 2, 5 ve 10 mM) hazırlanmıştır. Çalışmadan hemen önce taze olarak hazırlanan dozlar 72±4 saatlik transheterozigot larvalara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. Metiramın uygulanan dozlarının klon indüksiyon frekansları 0.92 ile 1.23 arasında değişmektedir. Toplam klon sayısı ve toplam *mwh* klon sayısı negatif kontrol grubunda 32 iken deney gruplarında 18-24 arasında değişmektedir. Negatif kontrol grubunda ikiz klon gözlenmezken pozitif kontrol grubunda 9 tane, 1 mM ve 5 mM'lık dozda 1 tane, 2 mM'da 2 tane gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede metiramın hiçbir dozunda genotoksik etki görülmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.4). Elde edilen sonuçlar klon frekansları bakımından grafik halinde Şekil 4.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Metiram'ın *Drosophila melanogaster*'in normal kanatlı bireylerinde somatik mutasyona etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (*m*=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (*m*=5)			İkiz klonlar (*m*=5)			Toplam *mwh* klonları (*m*=2)			Toplam klonları (*m*=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat (*mwh/flr*^{3})																	
Distile su	80	25	(0.31)		7	(0.09)		0	(0.00)		32	(0.40)		32	(0.40)		1.64
1 mM EMS	80	117	(2.16)	+	49	(0.91)	+	9	(0.17)	+	171	(3.19)	+	175	(3.24)	+	8.76
1	80	17	(0.21)	-	5	(0.06)	-	1	(0.01)	i	22	(0.28)	-	23	(0.29)	-	1.18
2	80	16	(0.20)	-	1	(0.01)	-	2	(0.03)	i	19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0.97
5	80	21	(0.26)	-	2	(0.03)	-	1	(0.01)	i	24	(0.30)	-	24	(0.30)	-	1.23
10	80	15	(0.19)	-	3	(0.04)	-	0	(0.00)	-	18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92

Fr., frekans; D.,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.4. Metiramın klon frekans dağılımı

5. TARTIŞMA

Tarım ürünlerindeki gerek kalite, gerekse verim kaybına neden olan mantar ve sporları ile mücadele için fungisitler kullanılmaktadır. TÜİK (2019) verilerine göre son on yıl boyunca ülkemizde en çok kullanılan pestisitler, fungisitler olmuştur. Ürünlerin korunması amacı ile yaygın olarak kullanılan bu kimyasalların çevreye ve insan sağlığına etkileri iyi araştırılmalı ve muhtemel zararlı etkilerine karşı da gereken önlemler alınmalıdır.

Tarım ürünlerinde kayıpları önlemek için pestisitlerin yaygın kullanıldığı dikkate alındığında, çevreye atılan bu kimyasalların insana ve ekosisteme olan muhtemel olumsuz etkileri de göz ardı edilmemelidir. Pestisitlerin gerek uygun kullanılmaması, gerekse kullanılması gereken dozdan fazla atılması nedeniyle hedef organizmaların pestisitlere karşı direnç kazanması da önemli sorunlardan biridir. Oluşan direncin kırılması ya da ortadan kaldırılması amacıyla alternatif daha güvenli pestisit arayışları sürmektedir. Yeni üretilen pestisitlerin, olası olumsuz etkilerinin ve hedef dışı organizmalara olan zararlı etkilerinin belirlenmesi için birçok araştırma yapılması gerekmektedir. Pestisitlerin zararlı etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar arasında, DNA ve kromozomlarda meydana gelen hasarların farklı genotoksikolojik testlerle belirlenmesi yaygın araştırmalardandır.

Bu çalışmada ülkemizde fungus kontrolünde yaygın olarak kullanılan dört fungisitin (metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl) genotoksik etkileri önemli bir model organizma olan *D. melanogaster* ile *in vivo* SMAR testi kullanılarak araştırılmıştır. Bu test sisteminde, 72±4 saatlik transheterozigot larvalar fungisit içeren *Drosophila* hazır besini ile 48 saat boyunca kronik maruziyete bırakılmıştır. Çalışmada *mwh*/*mwh* ve flr^3/*TM3,* Bd^s genetik özellikteki bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl fungisitleri suda çözdürülerek 1, 2, 5 ve 10 mM dozları 3. evre larvalara kronik olarak uygulanmıştır. Maruziyet sonucunda kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan delesyon, nokta mutasyonu ve ayrılmama gibi genetik değişimler fenotipte mutant kanat trikomlarındaki fenotipik farklılaşmalar şeklinde belirlenmiştir.

Propamocarb hydrochloride uygulamasından elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sadece çalışılan 10 mM'lık dozun ikiz klon kategorisinde bir miktar artış olduğu, fakat oluşan bu farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Diğer çalışılan dozlar ve kategorilerde ise negatif sonuçlar elde edilmiştir. Yani propamocarb hydrochloride için, uygulanan dozlarda *Drosophila* SMAR testinde genotoksik etki belirlenmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç, literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (EXTOXNET 1997, Aydemir ve Bilaloğlu 2004, FAO 2013a).

Propamocarb hydrochloridin potansiyel genotoksisitesinin belirlenebilmesi için çeşitli çalışmaların yapıldığı yayınlanmış raporlar ile gösterilmiştir. EXTOXNET (1997) tarafından yayınlanan raporda, *Salmonella* ve *E.coli* gen mutasyon analizleri, farelerde yapılmış iki mikronükleus deneyi, kültürdeki insan lenfositleri kullanılarak yapılan bir tane *in vitro* memeli sitogenetik deneyi, bir tane maya mitotik gen dönüşüm

deneyi ve bir tane maya mitotik rekombinasyon testini de kapsayan çalışmalarda propamocarb hydrochloride için genotoksik etki gözlenmemiştir.

Propamocarbın genotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada Swiss albino farelerde kemik iliği mikronükleusu ve kromozom sapmaları testleri ile genetik hasar incelenmiştir. Farelere intraperitonal olarak uygulanan dört farklı doz çalışılmıştır. Propamocarb uygulamasında, mikronükleer eritrositlerin frekansında artış gözlenmemiş, ancak tüm örnekleme aralıklarında polikromatik/normokromatik eritrosit oranları azalmıştır. Propamocarb, sadece toplam kromozom anomalilerindeki boşlukları artırmış, fakat boşluklar hariç tutulduğunda kontrol grubu ile doz grupları arasında toplam anormallikler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca propamocarbın, negatif kontrol grubuna göre mitotik indeksi de düşürdüğü saptanmıştır ($p<0.001$). Bu sonuçlara göre, propamocarbın *in vivo* fare kemik iliğinde genotoksik olmadığı ancak sitotoksik etkilerinin olduğunun söylenebileceği ifade edilmiştir (Aydemir ve Bilaloğlu 2004).

FAO (2013a)'da belirtildiğine göre, yapılan çalışmalar propamocarbın, kemirgenlerde kanserojen olmadığını göstermiştir. Propamocarb için yapılan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite çalışmalarında da genotoksik etkiye rastlanmamıştır. Genotoksisite eksikliğinin yanı sıra farelerde ve sıçanlarda kanserojenliğin bulunmadığı göz önüne alındığında, propamocarbın insanlarda kanserojen risk oluşturmadığı ifade edilmiştir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında propamocarb hydrochloridin genotoksik etkisiyle ilgili *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda propamocarb hydrochloridin genotoksik olmadığı bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen veriler, yayınlanmış literatür verileri ile aynı doğrultuda çıkmıştır.

Çalışmamızda kresoxim methylin 1 mM'lık dozunun küçük tek tip klonlarında ve bütün dozlarının ise ikiz klonlarında bir fark oluşmuştur, fakat oluşan bu farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Diğer çalışılan dozlar ve kategorilerde ise negatif sonuçlar elde edilmiştir. Yani kresoxim methyl, uygulanan dozlarda *Drosophila*'da genotoksik bulunmamıştır. Elde ettiğimiz bu sonuç, literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (FAO/WHO 1998, EPA 1998, Krieger 2001, EFSA 2010).

Kresoxim methylin genotoksik potansiyeli bakterilerde ve memeli hücrelerinde gen mutasyon testi, programlı olmayan DNA sentezi, *in vitro* sitogenetik, *in vivo* mikronükleus testleri ile araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar ile kresoxim methylin, eksojen metabolik aktivasyon ile *in vitro* kromozomal sapmaları orta seviyede indükleme potansiyelinin olduğu gösterilmiştir, ancak sıçan kemik iliğinde mikronükleus testleri gibi uluslararası kabul edilebilirliği yüksek birçok test sisteminde pozitif etkiler gözlenmemiştir (FAO/WHO 1998).

FAO/WHO'nın raporlarında kresoxim methylin genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Sıçanlarda yapılan çalışmada, kresoxim methylin üç ana metaboliti *Salmonella typhimurium*'da *in vitro* olarak geri mutasyona neden olmadığı gösterilmiştir (FAO/WHO 1998).

EPA (1998)'da mutajenite çalışmaları olarak *Salmonella*/memeli aktivasyon geni mutasyon analizi, Çin hamsteri yumurtalık CHO hücrelerinde gen mutasyonu analizi, insan lenfositlerinde *in vitro* kromozomal sapmalar deneyi ve farelerde *in vivo* mikronükleus deneyi yapıldığı belirtilmiştir. Diğer genotoksisite çalışmaları olarak da primer sıçan hepatositlerinde ve sıçan hepatositlerinde planlanmamış DNA sentezine bakılmıştır. Raporda mevcut çalışmalara dayanarak, kresoxim methyl için mutajenite endişesinin olmadığı belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada, kresoxim methyl yine genotoksik etki göstermemiş, fakat sıçanlarda maksimum dozda karaciğer tümörlerine sebep olmuştur (EFSA 2010, Krieger 2001). Kresoxim methylin genotoksisitesi ile ilgili *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile yapılan bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler daha önce yapılmış ve yayınlanmış çalışmalarla benzer doğrultudadır. Elde edilen verilere göre, kresoxim methylin *Drosophila* SMAR testinde de genotoksik olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızdaki hymexazol uygulamasından elde edilen sonuçlarda, 5 ve 10 mM'lık dozların ikiz klonlarında bir miktar artış gözlenmiştir, fakat oluşan bu artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Diğer çalışılan dozlar ve kategorilerde ise negatif sonuçlar elde edilmiştir. Yani hymexazolün, uygulanan dozlarda *Drosophila*'da genotoksik etkisi gözlenmemiştir. Literatürde EFSA (2010b) raporları dışında hymexazol ile yapılan genotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz sonuç, raporda belirtilen çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Genotoksisitenin değerlendirilmesi ile ilgili olarak hymexazol, sıçanlarda yapılan *in vivo* kromozom aberasyon testinde yüksek doz seviyesinde (2000 mg/kg bw, LD_{50}'ye yakın) mutasyon oranını az miktarda artırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte, fareler ile yapılan *in vivo* mikronükleus testinde, negatif sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca fareler ve sıçanlar ile yapılan uzun süreli çalışmalarda kanserojen potansiyel gözlenmemiştir. Elde edilen verilere göre hymexazolün insanlarda genotoksik olma olasılığı düşük olarak kabul edilmiştir (EFSA 2010b).

Tekrarlanan dozlarda yapılan çalışmalarda, kısa süreli maruziyetten sonraki ana hedef organ karaciğer (ağırlık, biyokimyasal ve histolojik değişiklikler) olarak belirlenmiştir, ancak uzun süreli çalışmalarda böbrekte (farede) ve tiroidte (sıçanda) de ağırlık artışı görülmüştür. Bir yıllık çalışmada NOEL=17 mg/kg bw/gün değeri olan köpek en hassas tür olarak belirlenmiştir. Sıçanlarda *in vivo* kromozom aberasyon testinde yüksek dozda hafif klastojenik olduğu bulunmuştur. Farelerde *in vivo* mikronükleus testinde genotoksik potansiyeli yoktur. İnsanlarda genotoksik olma olasılığının düşük olduğu ifade edilmiştir. Test edilen yüksek dozlarda tümörijenik etki olduğuna dair kanıt bulunmamıştır (sıçanlarda 532 mg/kg bw/gün; farelerde 2994 mg/kg bw/gün) (EFSA 2010b).

Hymexazolün genotoksisitesi ile ilgili *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda hymexazolün genotoksik olmadığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmamızdaki metiram uygulamasından elde edilen sonuçlarda, 1, 2 ve 5 mM dozların ikiz klonları kategorisinde kontrol grubuna göre bir miktar artış gözlenmiş ancak bu artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Diğer çalışılan dozlar ve kategorilerde ise negatif sonuçlar elde edilmiştir. Yani metiram, uygulanan dozlarda *Drosophila*'da SMAR testinden elde edilen verilere göre genotoksik bulunmamıştır. Elde ettiğimiz bu sonuç, literatürdeki WHO-JMPR (Joint Meeting of Pesticide Residues) ve EXTOXNET (1996) raporlarında belirtilen çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Metiramın genotoksisitesi ile ilgili güncel bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bolognesi ve Holland (2016) bildirdiğine göre, WHO-JMPR notlarında derlenmiş çalışmalara bakıldığında bakterilerde gen mutasyonu ve sıçan kemik iliğinde kromozomal aberasyon indüksiyonu negatif sonuç vermiştir. Toplantıda metiramın genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

EXTOXNET (1996), metiramın mutajenitesi ile ilgili yapılan altı testten beşinin negatif çıktığını bildirmiştir. Pozitif çıkan bir testin ise çok hassas bir test olduğu ifade edilmiştir. Bu verilerin metiramın ya mutajenik olmadığını ya da zayıf mutajenik olduğunu gösterdiği belirtilmiştir.

Elia vd. (1995) metiramın metaboliti olan ETU'nun kemirgenlerde tiroit tümörlerine ve farelerde karaciğer tümörlerine genotoksik olmayan bir mekanizma ile sebep olduğunu bildirmiştir. Dearfield (1994), ETU'nun zayıf genotoksik etkisi olduğunu belirtmiştir. FAO/WHO (1994), ETU'nun memelilerde genotoksik olmadığını ifade etmiştir (Elia vd. 1995).

ETU ile ilgili genotoksisite, gen mutasyonu ve kromozomal hasarı değerlendirmek için yapılan çalışmalarda mutajenik bulunmamıştır. Ayrıca, kemiricilerle yapılan çalışmalarda da ETU'nun memeli sistemlerinde mutajenik olmadığı ifade edilmiştir (Charles vd. 2000).

Çalıştığımız fungisitlerle ilgili genotoksisite çalışmalarının dışında yapılan diğer çalışmalar aşağıda sunulmuştur. Propamocarb hydrochloride ile ilgili olarak genotoksisite çalışmalarının dışında toksik etkisi, fizyolojik etkileri, sucul ekosistemdeki canlılara etkisi ve arılar üzerindeki etkisiyle ilgili araştırmalar bulunmaktadır.

Propamocarb hydrochloride ile ilgili yapılan toksisite çalışmalarına baktığımızda, memeli deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda, propamocarb hydrochloridin genel olarak akut toksisite açısından hafif toksik olduğu gösterilmiştir. Propamocarb hydrochloride düşük akut oral, dermal ve inhalasyon toksisitesine sahip olduğu yayınlanmış raporlar ile bildirilmiştir (EPA 1995; EFSA 2006).

Bazı pestisitler, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkması ile ilişkili ana çevresel faktörler olarak kabul edilmektedir. Zhang vd. (2019a) erkek yetişkin fareler ile yaptıkları çalışmada propamocarbın nörotransmitterlerin salgılanması ve davranış bozuklukları üzerindeki etkisini araştırmıştır. 2 hafta boyunca içme sularında 10-40 mg/L propamocarba (akut olarak) veya 10 hafta boyunca 3-10 mg/L propamocarba (kronik olarak) maruz bırakılmış olan farelerin serum ve

kolonlarında dopamin ve serotonin (5-HT) seviyelerinde değişim ve kolonlarındaki TPH2 ve DRD2'nin transkripsiyon aktivitesinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Buna ek olarak; lokomotor testi, açık alan testi ve Morris su labirenti analizi de propamocarba maruz kalmanın bir dereceye kadar davranışsal bozulmalara neden olduğunu, hafızayı zayıflattığı ve anksiyeteyi artırdığını göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar propamocarbın hayvanlarda nörotoksisiteyi indükleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Bir başka çalışmada kısa dönem propamocarb maruziyetinin yetişkin erkek zebra balıklarında bağırsak mikrobiyota disbiyozi ile ilişkili karaciğer metabolizma bozukluğunu indüklediği bulunmuştur. Yetişkin erkek zebra balıkları 7 gün 100-1000 µg/L propamocarba maruz bırakıldığında, 7 gün boyunca 1000 µg/L propamocarba maruz kalan zebra balıklarının karaciğerinde trigliserit seviyesi anlamlı ölçüde düşmüştür. Aynı zamanda glikoliz ve lipit metabolizmasıyla ilgili bazı genlerin mRNA sentezinde de önemli düzeyde azalmanın olduğu gösterilmiştir. mRNA sentezinde değişim görülen genlerin ağırlıklı olarak glikoliz, aminoasit ve lipit metabolizması yolaklarında görevli genler olduğu dikkat çekmektedir. En yüksek doz grubunda V3-V4 bölgesindeki 16S rRNA geninin sekanslanması yapılarak bağırsak mikrobiyotasının bolluğunda ve çeşitliliğinde de önemli bir değişiklik olduğu gösterilmiştir (Zhang vd. 2019b).

Wu vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmada fareler 10 hafta boyunca içme suyu yoluyla 1, 3 ve 10 mg/L propamocarba maruz bırakılarak, propamocarb maruziyetinin metabolizma ve barsak mikrobiyotası ile ilişkili yolaklar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre propamocarbın hepatik safra asitlerini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Karaciğer ve ileumda safra asitlerinin sentezi ve taşınımı ile ilgili genlerin transkripsiyonu önemli düzeyde değişmiştir. Safra asitleri, enerji metabolizması ve bağırsak mikrobiyotası ile çok yakından ilişkilidir, dolayısıyla beklendiği gibi hepatik glikoliz gözlenmiştir. Beta-oksidasyon; yağ asiti taşınımı, salınması ve sentezi; triasilgliserol sentezi ve taşınması transkripsiyon seviyesinde de önemli ölçüde değişimler gözlenmiştir. Uygulama sonucunda bağırsak mikrobiyotası hem çekal içerikte hem de dışkıda anlamlı olarak farklılaşmıştır. Bulgulara göre propamocarba kronik olarak maruz kalmanın enterohepatik metabolizmada bozuklukları indüklediği ve kardiyovasküler hastalık riskini artırma potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Propamocarb, funguslarda yağ asiti ve fosfolipit sentezine etki eden yaygın kullanılan bir fungisittir. Wu vd. 2018b, propamocarbın farelerin bağırsak mikrobiyata ve metabolizmasına etkisini araştırmak amacıyla 28 gün boyunca içme sularına 3, 30 ve 300 mg/L propamocarb eklemişlerdir. Lipit metabolizmasını düzenleyen hepatik genlerin transkripsiyonunun propamocarb tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Çekal içerik ve dışkıdaki mikrobiyata, propamocarb maruziyeti sırasında ve sonrasında sınıf veya cins seviyesinde önemli düzeyde değişmiştir.

Zararlıların kontrolü amacıyla doğaya atılan pestisitlerin ekosistemdeki hedef dışı diğer canlılar üzerindeki etkileri ile ilgili de çok yönlü çalışmalar yapılması gerekmektedir. Propamocarbın *Daphnia* üzerindeki toksikolojik incelemelerinde 48 saat maruziyette EC_{50}= 295 mg/L ve NOEC= 126 mg/L olarak bulunmuştur. Propamocarb hydrochloridin suda yaşayan organizmalar için çok düşük toksisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (EXTOXNET 1997).

Propamocarb hyrochloridin *Apis mellifera* ile temas toksisitesi 100 µg/arı'nın üzerinde bulunmuştur. *Apis mellifera*'ya verilen oral LD_{50} propamocarb hydrochloride miktarının, 84 µg/arı'dan büyük olduğu ifade edilmiştir (FAO 2013a). Pestisitler kullanılırken hedef olmayan organizmalara etkisinin düşük olması ekosistemin devamlılığı açısından oldukça önemlidir.

Kresoxim methyl ile ilgili genotoksisite çalışmalarının dışında toksik ve kanserojen etkisi, sucul ekosistemdeki canlılar, solucanlar, kuşlar, hedef olmayan eklembacaklılar ve bitkiler üzerindeki etkisi, ayrıca metabolitleriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır (FAO/WHO 1998, EPA 1998, Ypema ve Gold 1999, EFSA 2010a, Liu vd. 2013, Cui vd. 2017, Jiang vd. 2019).

FAO/WHO (1998)'e göre kresoxim methylin düşük akut toksisitesi vardır. Non-genotoksik, kanserojen ve tümör başlatıcıdır. Subkronik bir oral toksisite çalışmasında, sıçanların 3 ay boyunca diyetlerine 0, 500, 2000, 8000, ve 16000 ppm kresoxim methyl uygulanmıştır. Erkeklerde NOEL=2.000 ppm (146 mg/kg/gün), dişilerde ise 16000 ppm'dir (1374 mg/kg/gün) (EPA 1998). Fareler üzerinde yapılan bir oral subkronik toksisite çalışmasında, diyetlere 0, 250, 1000, 4000 ve 8000 ppm dozlarında kresoxim methyl uygulanmıştır. Her iki cinsiyet için de bir LOEL belirlenmemiştir. NOEL 8000 ppm olarak bulunmuştur (EPA 1998). Elde edilen NOEL miktarlarına bakıldığında kresoxim methylin oral yoldan alındığında toksisitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Tekrarlanan bir dermal toksisite çalışmasında, sıçanlara 21 gün boyunca günde 6 saat 0 ve 1000 mg/kg/gün dozlarında dermal maruziyet yapılmıştır. NOEL 1000 mg/kg/gün olarak bulunmuş, LOEL belirlenmemiştir (EPA 1998).

Kronik bir toksisite çalışmasında, sıçanlara diyetlerinde 24 ay boyunca 0, 200, 800, 8000 veya 16000 ppm dozlarında kresoxim methyl verilmiştir. Hem erkek hem de dişi sıçanlar için LOEL=8000 ppm olarak bulunmuştur. LOEL hesaplanırken erkeklerde SGGT seviyelerinin artmasına, karaciğerin ağırlığına ve histopatolojik değişikliklere bakılmıştır. Dişilerde ise kabaca %10 daha düşük vücut ağırlıkları ve çalışma boyunca kilo alımlarına bakılmıştır. Her iki cinsiyet için NOEL=800 ppm olarak bulunmuştur (EPA 1998).

Köpekler üzerinde yapılan kronik bir toksisite çalışmasında, diyetlerine 12 ay boyunca 0, 1000, 5000 veya 25000 ppm kresoxim methyl eklenmiştir. LOEL, erkekler için 25000 ppm'dir, bu değer azalmış ortalama vücut ağırlığı, vücut ağırlığı artışı ve düşük gıda verimi temeline dayanmıştır. Dişiler için LOEL tanımlanmamıştır. Erkekler için NOEL, 5000 ppm ve dişiler içinse 25000 ppm olarak bulunmuştur (EPA 1998).

Bir kanserojenik besleme çalışmasında, 24 ay boyunca sıçanların diyetlerine 0, 200, 800, 8000 veya 16000 ppm kresoxim methyl uygulanmıştır. Hem erkek hem de dişiler için LOEL=8000 ppm olarak bulunmuştur. Erkeklerde bu değer, vücut ağırlığındaki biraz azalmaya, vücut ağırlığındaki kilo artışına, brüt ve mikroskobik karaciğer (ve safra) lezyonlarındaki artışa göre hesaplanmıştır. Dişilerde LOEL, azalmış vücut ağırlıkları, kilo artışları ve karaciğer kitlelerinin görülme sıklığında artışa dayanmaktadır. Her iki cinsiyet için NOEL=800 ppm olarak bulunmuştur. Karaciğer karsinomu, sıçanların her iki cinsiyetinde primer neoplastik bulgu olarak ifade edilmiştir; histopatolojik bulgular ile uyumlu bulunmuştur (EPA 1998).

Farelerdeki bir kanserojenite toksisite çalışmasında, farelerin diyetlerine 18 ay 0, 400, 2000 ve 8000 ppm kresoxim methyl uygulanmıştır. LOEL, dişiler için 2000 ppm olarak bulunmuştur; bu değer azalan kilo alımına dayanmaktadır. LOEL erkekler için 8000 ppm; bu değer azalan kilo alımına ve karaciğer amiloidozuna dayanmaktadır. Dişiler için NOEL=400 ppm ve erkekler için 2000 ppm olarak tespit edilmiştir. Dozlar test edildiğinde ve kontrollerle karşılaştırıldığında tümör insidansında uygulamaya bağlı bir artış olmamıştır. Dozlama yeterli kabul edilmiştir ve yüksek doz oranı her iki cinsiyet için 1000 mg/kg/gün limit dozunun üstünde uygulanmıştır (EPA 1998).

Strobulinlerin yaygın kullanımı ve yüksek kalıntı oranları ekolojik çevredeki doğal organizmalar için potansiyel risk oluşturabilir. Strobulinlerin insanlar, kuşlar, memeliler ve arılar üzerinde düşük akut ve kronik toksisitesi olduğu düşünülmekle beraber, bu fungisitler hedef olmayan sucul organizmalar için (örn= *Daphina magna*, alabalık, kurbağa, midye ve ot sazanı) akut toksik olarak sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalar strobulinlerin balıklar üzerinde potansiyel immünotoksik veya endokrin bozucu etkileri olduğunu göstermiştir. Kresoxim methyl, strobulin ailesinden bir fungisittir. Jiang vd. (2019)'in bildirdiğine göre yapılan çalışmalarda ot sazanının juvenil döneminde kresoxim methyl için LC_{50}= 0.338 mg/L, *D. magna* embriyoları için LC_{50}= 0.157 mg/L, zebra balığının farklı yaşam evrelerinde ise LC_{50}= 0.334-0.61 mg/L olarak bulunmuştur (Cui vd. 2017; Liu vd. 2013; Wang vd. 2018). Kresoxim methyl, *D.magna* embriyolarında anormal gelişime sebep olabildiği ve üreme için LOEC=20 µg/L olarak bulunmuştur (Cui vd. 2017). Orta Avrupa'daki 20 nehirde yapılan ölçümlerde kresoxim methylin maksimum konsantrasyonu 2.9 µg/L olarak raporlanmıştır (Liess ve Von Der Ohe, 2005). Ayrıca ot sazanında oksidatif hasara yol açtığı ve 50 µg/L dozunda antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirebileceği ifade edilmiştir (Liu vd. 2013). Jiang vd. (2019)'nin kresoxim methylin zebra balığının (*Danio rerio*) larval gelişimindeki toksik etkisi ile ilgili yaptığı araştırmada LC_{50} değeri embriyolarda 0.340 mg/L, larvalarda 0.224 mg/L, juvenillerde 0.328 mg/L ve yetişkinlerde 0.438 mg/L olarak bulunmuştur. Larva dönemi, dört yaşam evresi içerisinde en hassas evre olarak belirlenmiştir. 45 genin transkripsiyonuna bakıldığında kresoxim methylin larval gelişimi birçok yolakta etkileyebildiği görülmüştür.

Cui vd. (2017), üç strobilurin fungisitin (kresoxim methyl, piraklostrobin ve trifloxistrobin) sucul toksisitesini araştırmak için *Daphina magna* ile yaptıkları çalışmada yenidoğan akut immobilizasyon testinde kresoxim methlyin 48 saatlik %50 efektif konsantrasyon (EC_{50}) değerini 443.3 mg/l olarak belirlemişlerdir. Ayrıca önemli bir detoksifikasyon enzimi olan glutatyon S-transferazın (GST) aktivitesi önemli ölçüde indüklenmiş ve akut maruziyetten sonra GST aktivitesi ve *D. magna* immobilitesi arasında anlamlı bir pozitif ilişki bulunmuştur. *D. magna* embriyolarında daha yüksek toksisite göstermiş ve 48 saat EC_{50}=157.3 mg/l olarak bulunmuştur. Yapılan testler, strobilurinlerin subletal konsantrasyonlarda, *D. magna*'nın üremesini, gelişmesini ve büyümesini de önemli ölçüde etkileyebileceğini ortaya koymuştur. LOEL=20 mg/l olarak bulunmuştur. Strobilurin fungisitlerinin *D. magna* için çok toksik olduğu belirlenmiştir.

EFSA (2010a)'da kresoxim methylin hedef olmayan organizmalar için düşük bir riski olduğunu söylemekle beraber özellikle sucul organizmalar üzerinde çok toksik etkileri bulunduğu belirtilmiştir. Arılar, solucanlar, hedef olmayan eklembacaklılar, toprak mikroorganizmaları ve bitkiler için düşük risk oranına sahip olduğu belirtilmiştir.

Kanada Pest Management Regulatory Agency (Haşere Yönetimi Düzenleyici Kurum) (2003) ise, uğur böcekleri için potansiyel risk oluşturduğunu bildirmiştir.

Bir bıldırcın türünde tek doz LD_{50} testi yapılmıştır ve LD_{50}>2150 mg ai/kg olarak bulunmuştur. Av kuşları türlerine pratik olarak toksik olmadığı kabul edilmiştir. NOEL=2150 mg ai/kg olarak ifade edilmiştir. Bluegill güneş balıkları ile akut bir LC_{50} testi yapılmış ve sonuçta LC_{50}=499 ppb ai'nin yüksek derecede toksik olduğu bulunmuştur. Gökkuşağı alabalığı ile bir akut LC_{50} testi yapılmış ve LC_{50}=190 ppb ai'nin yüksek derecede toksik olduğu bulunmuştur. Benzer bir test kresoxim methylin metaboliti kullanılarak yapıldığında LC_{50}>104 ppm ai/l'nin pratik olarak toksik olmadığı kabul edilmiştir. Kresoxim methylin seralarda gıda dışı kullanımlarda olumsuz etkileri olmasının muhtemel olmadığı belirtilmiştir (EPA 1998).

Liu vd. (2013), kresoxim methylin akut toksisitesini ölçmek için Çin'de önemli bir balık türü olan ot sazanının (*Ctenopharyngodon idella)* erken yaşam evresindeki bireylerini kullanmıştır. Juveniller için LC_{50}=0.338(0.284–0.407) mg/L olarak bulmuşlardır. Fungisitin, katalaz ve peroksidaz enzim aktivitesini artırdığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azalttığı, büyüme ile ilgili üç geni (IGF-1, IGF-2 ve GHR) ve enerji ile ilgili iki geni (CCK ve PYY) önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre kresoxim methylin sucul organizmalara ciddi zararlar verebileceği ifade edilmiştir.

Ypema ve Gold (1999), kresoxim methylin balıklar, *Daphnia* ve yeşil alg üzerine toksisitesinin olduğunu, uygun kullanma ve imha prosedürünün organizmaların bu maddeye maruz kalmasını önleyeceğini belirtmiştir.

Birçok kalıntı çalışmasında kresoxim methylin metabolitleri olan 490M2 ve 490M9 bulunmuştur, ancak bu metabolitlerin düşük toksisiteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Ruminantlarda, kalıntının ana bileşeni metabolit 490M9 olarak tespit edilmiştir, bileşik sadece çok düşük bağıl konsantrasyonlarda bulunmuştur. Kanatlılarda 490M9, karaciğerde bulunan ana bileşik olduğu için uygun bir gösterge bileşiği olabileceği belirtilmiştir (FAO/WHO, 1998).

Hymexazol ile ilgili genotoksisite çalışmalarının dışında toksisite, sucul ekosistemdeki canlılar, kuşlar, arılar, solucanlar, memeliler, hedef olmayan eklembacaklılar, topraktaki hedef olmayan mikroorganizmalar ve bitkiler üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Ypema, EFSA 2010b, Fan vd. 2018).

Oral uygulamadan sonra hızla ve yoğun bir şekilde absorbe edilen hymexazol, esas olarak idrar yoluyla hızla atılır (24 saat içinde>%95). Metabolizma esas olarak sülfürik ve glukuronik asitlerle konjugasyon yoluyla ortaya çıkar. Sıçanlarda oral LD_{50}=1600 mg/kg, farelerde oral LD_{50}=1700 mg/kg, tavşanlarda dermal LD_{50}>2000 mg/kg ve sıçanlarda soluma LC_{50}>0.65 mg/l/4 saat (ulaşılabilir en yüksek konsantrasyon, aerosol, tüm vücut) olarak bulunmuştur. Sıçanlarda oral NOEL=371 mg/kg bw/gün (90 gün), farelerde oral NOEL= 55 mg/kg bw/gün (90 gün) ve köpeklerde 17 mg/kg bw/gün (1 yıl) olarak belirlenmiştir (EFSA 2010b).

Fan vd. (2018) bildirdiğine göre; Ypema, kimyasal tarım ansiklopedisinde, sistemik bir fungisit olmasından dolayı hymexazolün Japon bıldırcınlarında ve yeşilbaş

ördekte düşük toksik etkiye sahip olduğunu ifade etmiştir. Balıklardaki toksisitesini araştırmak amacıyla sazanlarda ve gökkuşağı alabalıklarında çalışılmıştır. 96 saat maruziyetten sonra sazan için LC_{50}=165 mg/L, gökkuşağı alabalığı için LC_{50}= 460 mg/L olarak bulunmuştur. Fan vd. (2018)'in çalışmalarında, zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları, gelişim toksisitesi, melanin biyosentezi, biyokimyasal ve transkripsiyonel sonuçlarını çalışmak için farklı konsantrasyonlarda hymexazole maruz bırakılmıştır. Emrbriyo toksisite testleri 96 saat LC_{50}=649 mg/L olarak göstermiştir. 417-738 mg/L dozlarındaki hymexazol kalp atış hızını düşürmüştür. 554 mg/L'in üzerindeki konsantrasyonlarda hymexazol normal gelişimi engellemiştir ve 96 saat için EC_{50}= 411 mg/L olarak bulunmuştur. 417-738 mg/L arasındaki konsantrasyonlar, kalp ve yumurta sarısı ödemine sebep olmuştur. Bu konsantrasyonlarda 48 saat hymexazole maruz kalma zebra balığı embriyolarında pigment alan yoğunluğunu azaltmıştır. Deney gruplarında tirozinaz aktivitesi inhibe edilmiştir. 480 mg/L ve üzeri dozlarda hymexazole maruz kalan embriyolarda p53 mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir. Sonuç olarak, hymexazolün zebra balığında düşük akut toksisiteye ve düşük embriyonik toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur.

Hymexazolün böcekçil kuşlar için kısa dönem toksisiteye maruz kalma oranlarını araştıran ilk çalışmada düşük risk bulunurken, akut ve uzun dönem toksisiteye maruz kalmayla ilgili domateslerde yapılan çalışmada böcekçil kuşlar için potansiyel akut ve uzun dönem yüksek risk olduğu bulunmuştur. Bu durumun kalıntı miktarları arasındaki farktan olduğu düşünülmüştür (EFSA 2010b).

Domateslerde kullanımında memelilerin toksisiteye maruz kalmasında düşük bir akut ve kronik risk olduğu tespit edilmiştir. Hymexazolün şeker pancarında kullanımında otçul memeliler için düşük bir akut risk tespit edilmiştir (EFSA 2010b).

Hymexazol sucul organizmalar için çok toksiktir. Uzmanlar yapılan tartışmalar sonucunda *Daphnia magna* için NOEC=0.8 mg/L yerine EC_{10}=0.4 mg/L'yi değerini kullanmaya karar vermişlerdir. Domateslerde ve şeker pancarında kullanımının sudaki organizmalar için düşük bir risk oluşturduğu düşünülmektedir. RMS (Risk Management Solutions), 2010'da Finlandiya'da 5-metil-2 (3H) -oksazolon metabolitinin hymexazolden 10 kat daha yüksek toksisitede olduğu varsayımına dayanarak bir risk değerlendirmesi sağlamıştır. Şeker pancarında kullanımında düşük risk tespit edilmiştir. Bununla birlikte, dış ortamdaki domateste kullanımında sucul omurgasızlar ve sedimanda yaşayan organizmalar için yüksek bir risk tespit edilmiştir. Metabolit 5-metil-2 (3H) -oksazolon riskini değerlendirmek için daha fazla araştırmanın gerekli olduğu düşünülmüştür (EFSA 2010b).

Arılar, hedef olmayan eklembacaklılar, solucanlar, topraktaki hedef olmayan mikroorganizmalar, hedef olmayan bitkiler ve biyolojik atık su arıtma yöntemleri için düşük risk oluşturduğu kararlaştırılmıştır. Arılarda akut oral toksisitede LD_{50}>100 µg/arı, akut kontakt toksisitede LC_{50}>100 µg/arı olarak tespit edilmiştir (EFSA 2010b).

Ewence vd.(2015), endokrin bozucu pestisitleri belirlemek için 98 pestisit çeşidiyle yapılan çalışmaları gözden geçirmişlerdir. Bu çalışmaya göre kresoxim methyl ve propamocarbın endokrin bozucu olduğunun düşünülmediği ifade edilmiştir. Hymexazolün ise endokrin bozucu olup olmadığının anlaşılması için daha fazla veriye ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir.

Metiram ve metaboliti ETU ile ilgili toksik, kanserojenik, fizyolojik etkileri, tiroid bezi üzerine etkisi ve solunum yolu hastalıklarına sebep olması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Steenland vd. 1997, Charles vd. 2000, Panganiban vd. 2004, EPA 2005, Bolognesi ve Holland 2016, Campos ve Freire 2016, Judson vd. 2017, Jardim vd. 2018, Chou 2019, Piel vd. 2019, Raherison vd. 2019).

Charles vd. (2000) metiramın subkronik ve kronik toksisitesini ve kanserojen potansiyelini araştırmışlardır. Sıçanların diyetlerine 0, 5, 20, 80 ve 320 ppm metiram eklemişlerdir. Dişi farelere 89 hafta, erkek farelere ise 95 hafta 0, 100, 300 ve 1000 ppm metiram diyetlerine uygulanmıştır. İki türde de onkojenik bir yanıt olmamıştır. Tiroidin hedef organ olduğu görülmüştür. Sıçanlarda NOEL=80 ppm, farelerde NOEL=300 ppm olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, metiramın kemirgenlerde karsinojenik olmadığını göstermiştir.

Akut, kronik ve kanser diyeti (sadece yiyecek) çalışmalarında, metiram ve metiram kaynaklı ETU'nun riski düşük bulunmuştur. Metiram için içme suyuna maruz kalma değerlendirmesi, sadece ETU konsantrasyonlarına yöneliktir; çünkü metiramın, yüzeysel veya yeraltı suyu kaynaklarına, insan tüketimi için su sağlayacak bir yere ulaşması için yeterince uzun süre içme suyunda kalması beklenmediği belirtilmiştir. İçme suyu yüzeyindeki ve yeraltı suyu kaynakları için tahmini ETU konsantrasyonlarının düşük olduğu ve endişe verici olmadığı ifade edilmiştir. ETU'nun, potansiyel kanserojen, gelişimsel ve tiroid etkileri olduğu, metiram ve diğer EBDC'ler için risk endişelerinin çoğunun ETU'den kaynaklandığı belirtilmiştir (EPA 2005).

Tavşanlarda yapılan çalışmada besinlere 0.01 mg/kg/gün metiram karıştırıldığında NOEL=10 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan subkronik oral toksisite çalışmasında NOEL=0.4 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (EPA 2005).

Fransa'da yapılan geniş çaplı bir araştırmada tarım işçilerinin karbamat herbisit ve fungisitlere maruziyeti ile merkezi sinir sistemi (MSS) tümör oranları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ortalama 6.9 yıllık bir takipte, 381 MSS tümör vakası olmuştur. Yapılan analizler, genel olarak karbamat fungisitlere maruz kalma ile MSS tümörlerinde risk artışı olduğunu göstermiştir [Tehlike oranı(HR), HR=1.88, %95 Güven aralığı(CI) CI:1.27-2.79]. Karbamat herbisitlerde daha düşük bir risk artışı bulunmuştur (HR=1.44, %95 CI: 0.94-2.22). Mancozeb, maneb, metiram gibi bazı spesifik fungisitler ve chlorpropham, propham, diallate gibi herbisitler ile tümör oluşumu arasında pozitif ilişki görülmüştür (Piel vd. 2019).

Brezilya popülasyonunda triazole(TR) ve dithiokarbamat(DT) fungisitlerin olasılıklı diyet risk değerlendirmesi yapılmıştır. İki ulusal izleme programında 30 gıda çeşidinden alınan 30786 incelenen örnekte tespit edilen TR ile DT kalıntı değerleri ile 10 yaş ve üzeri tüketicilerle yapılan anket kullanılmıştır. Bu çalışmada incelenen örneklerin %16.2'sinin DT içerdiği bulunmuştur. Başlıca DT kalıntısı içeren gıda %59.3 ile elmadır. TR ve DT'ye maruziyetten kaynaklanan tahmini risklerin, Brezilya populasyonu için herhangi bir sağlık sorunu olmadığını gösterdiği ifade edilmiştir (Jardim vd. 2018).

Macozeb, maneb, metiram, propineb ve zinebin tiroid toksisitesini indüklediği rapor edilmiştir. Hayvanlarda yapılan bir çalışmada organın büyüklüğü, kalınlığı ve ağırlığı artmış ve foliküler hiperplazi görülmüştür (Chou 2019).

Judson vd. (2017), kimyasal kaynaklı anemi için U.S. EPA Toxicity Reference Database'deki *in vivo* verilerini analiz etmiştir. Bunun için 1738 çalışmada (subkronik veya kronik sıçan, fare veya köpek) bir veya daha fazla test edilmiş 658 kimyasal ile ilgili hematolojik verileri kullanmışlardır. Buna göre metiram-çinko, molinate ve 4 aniline ile ilgili bileşiğin (novaluran, fenhexamid, propanil ve flufenacet) önemli kilo kaybı ve sistemik toksisite etkisi olan dozların altında çoklu tür anemi gösterdiği bulunmuştur.

EBDC sınıfındaki metiram ve mancozeb, metabolitlerine dayanarak olası insan kanserojeni olarak sınıflandırılmışlardır. Metabolitleri olan ETU, kemirgenlerde tiroid tümörlerine sebep olmuştur (Bolognesi ve Holland 2016).

Steenland vd. (1997)'in çalışmasında, ilaçlamayı yapan küçük bir grup ile ilaca maruz kalmayan iki grup karşılaştırılarak, EBDC fungisitlerine maruz kalma, idrardaki ETU metabolitleriyle değerlendirilmiştir. İlaçlamayı yapan kişilerin kontrol gruplarına göre TSH seviyeleri anlamlı olarak artmıştır, T4 ise gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Panganiban vd. (2004)'in muz yetiştiren işçilerden EBDC fungisitlerine maruz kalanlar arasında yaptıkları çalışmada ise, yine maruz kalanların TSH seviyeleri istatiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek çıkmıştır. Kan ETU seviyeleri TSH ile ilişkili değildir, fakat tek tiroid nodülünün büyüklüğü ile güçlü bir ilişkisi olduğu ifade edilmiştir (Campos ve Freire 2016).

ETU, tiroidi hedef alan bir kimyasaldır. Sıçan, fare ve köpeklerle yapılan subkronik ve kronik çalışmalarda ETU maruziyetinin bir sonucu olarak tiroid toksisitesi belirtilmiştir. Bir kronik köpek çalışmasında, aşırı karaciğer toksisitesi gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan çalışmada hidrosefali ve ilişkili lezyonları, iskelet sistemi kusurları ve diğer kaba kusurları içeren gelişimsel bozukluklar görülmüştür. Bu defektler, yalnızca anne yemek tüketiminde ve kilo alımında azalmaya neden olan bir dozda meydana geldiği için fetuslarda duyarlılığı artırdığını göstermiştir (EPA 2005).

Dişi sıçanlarla yapılan akut besleme çalışmasında ETU için NOEL=5 mg/kg/gün ve LOEL=10 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Köpeklerle yapılan kronik besleme çalışmasında ise NOEL=0.18 mg/kg/gün, LOEL= 1.99 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. İnsanlar için kısa dönem ETU'ya maruz kalındığında NOEL=5 mg/kg/ gün, uzun dönem maruz kalındığında NOEL=0.18 mg/kg/gün'dür (EPA 2005).

Fransa'da bağ kırsal alanlarında hava yolu ile pestisitlere maruz kalma ve çocukların solunum sağlığıyla ilişkisi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Seçilen dört okuldan 3-10 yaş arası çocuklar, yaz ve kış mevsimi olmak üzere çalışmaya iki periyotta katılmıştır. Çalışmaya katılan 281 çocuğun, %25'i çiftlikte yaşamaktadır, %22'si en az bir kez hırıltılı nefes sorunu yaşamış, %15.8'ine doktor tarafından astım teşhisi konulmuş, %12'si astım hastası ve %35'inin alerjik riniti vardır. Okul çevresindeki havada tespit edilen ana pestisit fungisitler (%89.3 oranında; özellikle folpet ve dithiocarbamates) ve insektisitler (%10.6) olmuştur. Pestisitlerin yoğun kullanıldığı yaz mevsiminde, okul çevresindeki havada yapılan ölçümler ile çocuklarda görülen

semptomlar arasında bir ilişki bulunmamıştır. Bununla birlikte idrardaki ETU konsantrasyonu (>0.974 µg/g kreatinin) ile astım ve rinit semptomları arasında ilişki bulunmuştur. Bu sonucun okul dışı maruziyet ile açıklanabileceği bildirilmiştir (Raherison vd. 2019).

Gıdalarımız ve hayvan yemleri üzerinde bazen tarım ürünlerinde kullandığımız pestisitlerin kalıntılarına veya bunların metabolitlerine rastlanabilmektedir. Bu kalıntı miktarları belli bir dozun üzerinde olduğunda sağlık açısından önemli riskler oluşturabilmektedir. Ülkelerin kullanılan pestisitler için belirlenmiş olan sınır kalıntı değerleri vardır ve gıda ithalatı sırasında bu değerlere dikkat edilmektedir. Pestisitlerin ürün üzerinde parçalanma süresi dikkate alınarak, her pestisit için son ilaçlamadan ne kadar süre sonra hasat yapılabileceği belirtilir. Üreticiler bu süreleri dikkate almadığında gıdalar üzerinde pestisit kalıntısı bulunması kaçınılmaz olacaktır. Bu sürenin kısa olması kalıntı olmaması ve besin zinciri yoluyla taşınmaması bakımından avantaj sağlar.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl oral yoldan alındığında *Drosophila*'da genotoksik bulunmamıştır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada ülkemizde fungus kontrolünde yaygın olarak kullanılan dört fungisitin (Metiram, propamocarb hydrochloride, hymexazol ve kresoxim methyl) genotoksik etkileri model organizma *D. melanogaster* ile yapılan *in vivo* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılmıştır. Potansiyel genotoksik etkileri incelenen fungisitlerden metiram klasik fıngisit kategorisinde iken, diğerleri modern fungisitler olarak tanımlanmaktadır. Çalışılan fungisitlerin hiçbiri *Drosophila*'da SMAR testinde genotoksik etki göstermemiştir.

Seçtiğimiz bu fungisitlerin genotoksik etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalarda *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin kullanılarak genotoksisitenin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması bu boyutu ile literatüre bu yönde önemli bir katkı sağlamıştır. *Drosophila*'nın ökaryotik bir organizma olması, kullanılan testin *in vivo* bir yöntem olması bulgular açısından önemlidir.

Yapılan tez çalışmasında normal metabolik aktiviteye sahip genetik hatlar kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Bazen pestisitler biyoaktivasyon gösterirken kendilerinin değil, metabolitlerinin yüksek genotoksik etkileri olabilmektedir. Örneğin, bu çalışmada değerlendirilen metiramın kendisinden daha çok metaboliti olan ETU'nun toksik etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Pestisitlerin metabolitlerinin genotoksik etkilerini incelemek için yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila*'lar ile SMAR testi yapılarak bu tür etkilerin belirlenmesi bilime katkı bakımından önemli olacaktır.

Kullanılan pestisitlerin bir kısmının, gıda olarak kullanılan tarım ürünleri üzerinde kalıntısı olabilmektedir. Kalıntı miktarları ve insan sağlığına etkileri konusunda detaylı ve uzun dönemli çalışmalara ihtiyaç vardır. Tarımsal üretimin fazla olduğu bölgelerde yetiştirilen ürünler üzerindeki kalıntı miktarlarının muhtemel etkileri çalışılarak olası olumsuz sonuçların önüne geçilmiş olacaktır.

Yapılan literatür araştırmasında, çalışılan fungisitlerin sucul ortamda yaşayan canlılar için toksik olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Kullanılan pestisitlerin su kaynaklarına bulaşmamasına, yağmur veya sulama suyu ile bu kaynaklara ulaşmamasına dikkat edilmesi gerekir. Pestisitlerin sucul ekosistemde yaşayan organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sucul organizmaların pestisitlerden etkilenmesinin önlenmesi hem ekosistemin korunması hem de besin zincirinin sağlıklı olarak işlemesi bakımından önemlidir. Bu bağlamda uygulama yapılan pestisitlerin sucul sisteme ulaşmaması konusunda önlemler alınmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Gıda ihtiyacını karşılamak ve ekonomik kayıpları önlemek için pestisit kullanımı kaçınılmazdır. Hedef olmayan canlıları olumsuz etkilememek ve çevre kirliliğine neden olmamak için güvenli pestisitler kullanılmalıdır. Kullandığımız pestisitlerin hedef türler dışındaki canlılar üzerinde toksik etkisinin düşük olması, tozlaşma için önemli bir vektör olan arılara ve sucul ekosistemdeki canlılara zarar vermemesi, tarım ürünü üzerindeki kalıntı miktarının düşük olması önemlidir. Aynı zamanda tüketicinin doğru pestisiti önerilen dozda ve uygun yöntemle kullanması, son ilaçlama ile hasat arasındaki

süreye dikkat etmesi, gereksiz pestisit kullanımından kaçınması istenmeyen etkilerin gözlenmesini azaltacaktır.

Günümüzde toksik olduğu bilinen bazı pestisitlerin kullanımına halen devam edilmesi hedef dışı canlıları olumsuz etkilemektedir. Bunların yerine kullanılabilecek daha güvenli pestisitler geliştirilmeli, hedef olmayan canlılar üzerindeki olumsuz birçok etki önlenmelidir. Zararlı organizmalar zaman içerisinde pestisitlere karşı direnç geliştirerek dayanıklılıklarını artırabilmektedirler. Bu yüzden de tarım zararlıları için yeni ve güvenli mücadele yolları ve alternatif pestisitler bulmak gerekmektedir.

Ülkemizde en çok kullanılan pestisit çeşitinin fungisitler olduğu düşünüldüğünde fungusların türleri, genetik yapısı, üremesi, bulaşması, metabolizması ile ilgili yapılacak araştırmalar yeni fungisit geliştirme çalışmalarına ışık tutacaktır. Ayrıca üretilen fungisitlerin olası farklı genotoksik etkilerini değerlendirmek için çeşitli model organizma ve yöntemler kullanılması, kullanılan pestisitlerin güvenirliliğinin onaylanması bakımından da önemlidir.

7. KAYNAKLAR

Ağar, S., Aydınlıoğlu, H., Temel, O., İkizünal, K., Ece, H.1991. Pestisit kullanımın tarihçesi, bugünü ve geleceği. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 15(4):247-256.

Altıkat, A., Turan, T., Torun, F.E., Bingül, Z. 2009. Türkiye'de pestisit kullanımı ve çevreye olan etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(2): 87-92.

Arslan, S. ve Çiçekgil, Z. 2018. Türkiye'de tarım ilacı kullanım durumu ve kullanım öngörüsü. TEAD, 4(1): 1-12.

Aydemir, N. and Bilaloğlu, R. 2004. The investigation of the genotoxic effects of fenarimol and propamocarb in mouse bone marrow in vivo. *Toxicology Letters*, 147: 73-78.

Beira, J.V., Paro, R. 2016. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma* 125:573–592.

BKU (Bitki koruma ürünleri veri tabanı). 2019a. Aktif Madde %50 Kresoxim-methyl. Tarım ve Orman Bakanlığı. https://bku.tarim.gov.tr/AktifMadde/Details/739 [Son Erişim Tarihi: 01.05.2019]

BKU (Bitki koruma ürünleri veri tabanı). 2019b. Aktif Madde 722 G/L Propamocarb HCl. Tarım ve Orman Bakanlığı. https://bku.tarim.gov.tr/AktifMadde/Details/684 [Son Erişim Tarihi: 01.05.2019]

BKU (Bitki koruma ürünleri veri tabanı). 2019c. Aktif Madde 360 G/L Hymexazole. Tarım ve Orman Bakanlığı. https://bku.tarim.gov.tr/AktifMadde/Details/190 [Son Erişim Tarihi: 01.05.2019]

BKU (Bitki koruma ürünleri veri tabanı). 2019d. Aktif Madde %80 Metiram. Tarım ve Orman Bakanlığı. https://bku.tarim.gov.tr/AktifMadde/Details/495 [Son Erişim Tarihi: 01.05.2019]

Bolognesi, C. ve Holland, N. 2016. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutation Research*, 770: 183-203.

Campos, E. ve Freire C. 2016. Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219: 481-497.

Canik, F., Yüksel, N.Y. 2012. Gıda güvenliği ve pestisitler. *TEPGE Bakış*, 14: 1-4.

Charles, J. M., Tobia, A., Ravenzwaay, B.V. 2000. Subchronic and Chronic Toxicological Investigations on Metiram: The Lack od a Carcinogenic Response in Rodents. *Toxicological Sciences*, 54: 481-492.

Chou, W.C., Tsai, W. R., Chang, H.H., Lu, S.Y., Lin, K.F., Lin, P. 2019. Prioritization of pesticides in crops with a semi-quantitative risk ranking method for Taiwan postmarket monitoring program. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27: 347-354.

Cui, F., Chai, T., Liu, X., Wang, C. 2017. Toxicity of three strobilurins (kresoxim-methyl, pyraclostrobin ve trifloxystrobin) on Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(1): 182–189.

Dearfield, K.L. 1994. Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies, *Mutation Research* (317): 111-132.

Delen, N. 2016. Fungisitler. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 534 s.

Demir, E. 2011. Ayçiçek ve soya yağlarının kızartma ve kaynatma ürünlerinin *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 130 s.

EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propamocarb. *EFSA Journal,* 78: 1-80.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance kresoxim-methyl. *EFSA Journal,* 8(11):1891.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol. *EFSA Journal,*8(8): 1653.

EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for kresoxim-methyl according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal,* 12(1): 3549.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015a. Modification of the existing maximum residue level for kresoxim-methyl in leeks. *EFSA Journal,* 13(8):4215. doi:10.2903/j.efsa.2015.4215

EFSA (European Food Safety Authority). 2015b. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal,*13(3): 4038. doi:10.2903/j.efsa.2015.4038

Elia, M. C., Arce, G., Hurt, S. S., O'Neill, P. J., Scribner, H. E. 1995. The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemical's genotoxic potential. *Mutation Research* (341): 141-149.

EPA, (United States Enviromental Protection Agency). 1995. R.E.D. Facts Promocarb Hydrochloride. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-119301_1-Sep-95.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.07.2018]

EPA, (United States Enviromental Protection Agency). 1998. Pesticide Fact Sheet: Kresoxim-methyl. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-129111_01-Sep-98.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.07.2018]

EPA, (United States Enviromental Protection Agency). 2005. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Metiram. EPA 73-R-05-017. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-014601_29-Aug-05.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.07.2018]

EPA 1, (United States Enviromental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision Propamocarb Hydrochloride List C Case 3124. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/3124red.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.07.2018]

Erkmen, O. 2010. Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi,* 53: 220-235.

EXTOXNET (Extension Toxicology Network). 1996. Metiram. http://extoxnet.orst.edu/pips/metiram.htm [Son Erişim Tarihi: 05.10.2019]

EXTOXNET (Extension Toxicology Network). 1997. Propamocarb. http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/propamocarb-ext.html [Son Erişim Tarihi: 07.03.2019]

Ewence, A., Brescia, S., Johson, I., Rumsby, P.C. 2015. An approach to the identification and regulation of endocrine disrupting pesticides. *Food and Chemical Toxicology,* 78: 214-220.

Fan, Y., Miao, W., Lai, K., Huang, W., Song, R., Li, Qing. 2018. Developmental toxicity and inhibition of the fungicide hymexazol to melanin biosynthesis in zebrafish embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 147: 139-144.

FAO/WHO. 1994. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO expert group on pesticide residues, Geneva, 20-29 September, 1993. Food and Agriculture Organization of the United Nations plant production and protection paper 122.

FAO/WHO. 1998. Pesticide residues in food. FAO Plant Production and Protection Paper 148.

FAO/WHO. 2014. International Code of Conduct on Pesticide Management.Rome. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/CODE_2014Sep_ENG.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.03.2019]

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013a. Propamocarb. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Propamocarb_2013.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.03.2019]

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013b. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. http://www.fao.org/3/a-bc870e.pdf [Son Erişim Tarihi: 07.03.2019]

Frei, H. and Würgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research,* 203: 297-308.

Garcia-Bellido, A. and Merriam, J.R. 1971. Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology,* 24: 61-87.

Gawel, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, Olga., Posyniak, A. 2019. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry,* 282: 36-47.

Golge, O., Hepsag, F. ve Kabak, B. 2018. Health risk assessment of selected pesticide residues in green pepper and cucumber. *Food and Chemical Toxicology,* 121: 51-64.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juan, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6: 153-188.

Graf, U., Schaik, N. V., Wtirgler F. E. 1992. *Drosophila* genetics, A Practical Course. Springer-Verlag, Berlin, 239 s.

Graf, U. 1995. Analysis of relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51: 168-173.

Gupta, P. K. and Aggarwal, M. 2012. Chapter 55 Toxicity of Fungicides. Veterinary Toxicology, Elsevier, 18 p. DOI:10.1016/B978-0-12-385926-6.00066-1

Jardim, A.N.O., Mello, D. C., Brito, A.P., Voet, H.V., Boon, P.E., Caldas, E.D. 2018. Probabilistic dietary risk assessment of triazole and dithiocarbamate fungicides fort he Brazilian population. *Food and Chemical Toxicology*, 118: 317-327.

Jiang, J., Lv, L., Wu, S., An, X., Wang, F., Zhao, X. 2019. Developmental toxicity of kresoxim-methyl during zebrafish (Danio rerio) larval development. *Chemosphere*, 219: 517-525.

Judson, R.S., Martin, M.T., Patlewicz, G., Wood, C.E. 2017. Retrospective mining of toxicology data to discover multispecies and chemical class effects: Anemia as a case study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86: 74-92.

Kasımoğlu, C. 2016. Bazı insektisitlerin çeşitli somatik hücrelerde i*n vivo* ve *in vitro* olarak genotoksik etkilerinin belirlenmesi ve olası etkilerinin Kuşburnu (*Rosa canina* L.) bitkisine ait ekstreler kullanılarak giderilmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 152 s.

Kaya, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 134 s.

Krieger, R. 2001. Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 2, Academic Press, USA.

Liess, M., Von Der Ohe, P.C.. 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicololgy Chemistry*, 24: 954-965.

Liu, L., Jiang, C., Wu, Z., Gong, Y., Wang, G. 2013. Toxic effects of three strobilurins(trifloxystrobin,azoxystrobinand kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 297–302.

Özkan, B., Akçagöz, H.V., Karaman, S., Taşçıoğlu, Y. 2002. Antalya ilinde serada sebze üretiminde pestisit kullanımının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. *Bahçe*, 31(1-2): 9-16.

Panganiban, L., Cortes-Maramba, N., Dioquino, C., Suplido, M.L., Ho, H.,Francisco-Rivera, A., Manglicmot-Yabes, A. 2004. Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environmental Health Perspective*, 112: 42–45.

Parry, J. M. and Parry, E. M. 2012. Genetic Toxicology Principles and Methods. Humana Press-Springer, New York, 441 p.

Piel, C., Pouchieu,C., Carles, C., Beziat, B., Bounlanger, M., Bureau, M., Busson, A., Grüber, A., Lecluse, Y., Migault, L., Renier, M., Rondeau, V., Schwall, X., Tual, S., the AGRICAN group, Lebailly, P., Baldi, I. 2019. Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. *Environmental International*, 130 (104876): 1-11.

PMRA (Pest Management Regulatory Agency). 2003. Kresoxim-methyl Technical and Sovran® Fungicide. Proposed Regulatory Decision Document - PRDD2003-05. Canada.

Raherison, C. Baldi, I., Pouquet, M., Berteaud, E., Moesch, C., Bouvier, G., Canal-Raffin, M. 2019. Pesticides exposure by air in vineyard rural area and respiratory health in children: A pilot study. *Environmental Research*, 169: 189-195.

Roberts, T.R., Hutson, D.H., Lee, P.W., Nicholls, P.H., Plimmer, J.R. (Eds.). 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals-Part 2: Insecticides and Fungicides. *Royal Society of Chemistry*, 1431-1435.

Sierra, L. M. and Gaivao, I. 2014. Genotoxicity and DNA Repair. Humana Press-Springer, New York, 480p.

Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V. 2019. Pesticide residues in European agricultural soils-A hidden reality unfolded. *Science of the Total Environment*, 653: 1532-1545.

Steenland, K., Cedillo, L., Tucker, J., Hines, C., Sorensen, K., Deddens, J., Cruz, V. 1997. Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environmental Health Perspective*, 105: 1126–1130.

Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. 2011a. Genetik Toksisite Testleri. *Türk Bilim Araştırmaları Vakfı Dergisi*, 4(3): 221-229.

Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. 2011b. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4): 241-252.

Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 2016. EK 2. http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/11/20161125M1-1.htm [Son Erişim Tarihi: 19.05.2019]

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu). 2019. Tarımsal İlaç Kullanımı. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 [Son Erişim Tarihi: 01.05.2019]

Vera, T., Muñoz, A., Ródenas, M., Vázquez, M., Borrás, E. Marqués, M., Mellouki, A., Treacy, J., Sidebottom, H. 2011. Atmospheric fate of hymexazol (5-methylisoxazol-3-ol): Simulation chamber studies. *Atmospheric Environment*, 45: 3704-3710.

Vogel, E.W. and Nivard M.J.M. 2000. Parallel monitoring of mitotic recombination, clastogenicity and teratogenic effects in eye tissue of *Drosophila*. *Mutation Research*, 455:141–153.

Wang, Y., Dai, D., Yu, Y., Yang, G., Shen, W., Wang, Q., Weng, H., Zhao, X. 2018. Evaluation of joint effects of cyprodinil and kresoxim-methyl on zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Hazardous Material*, 352, 80-91.

WHO-JMPR Toxicological Monographs- Pesticide residues in food. http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr13.htm [Son Erişim Tarihi: 28.09.2019]

Wu, SS., Luo, T., Wang, SY., Zhou, JC., Ni, YC., Fu, ZW., Jin, YX. 2018a. Chronic exposure to fungicide propamocarb induces bile acid metabolic disorder and increases trimethylamine in C57BL/6J mice. *Science of The Total Environment*, 642: 341-348. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.084

Wu, S., Jin, C., Wang, Y., Fu, Z., Jin, Y. 2018b. Exposure to the fungicide propamocarb causes gut microbiata dysbiosis and metabolic disorder in mice. *Environmental Pollution*, 237: 775-783.

Ypema, H. L., Gold, R. E. 1999. Kresoxim-methyl. *Plant Disease*, 83(1): 4-19.

Ypema, H., Fungicides, hymexazol. Encyclopedia of Agrochemicals https://doi.org/10.1002/047126363X.agr110

Zhang, Y., Jin, C., Wang, X., Shen, M., Zhou, J., Wu, S., Fu, Z., Jin, Y. 2019a. Propamocarb exposure decreases the secretion of neurotransmitters and causes behavioral impairments in mice. *Environmental Toxicology*, 34, 22-29. https://doi.org/10.1002/tox.22653

Zhang, Y., Pan, Z., Wang, X., Shen, M., Zhou, J., Fu, Z., Jin, Y. 2019b. Short-term propamocarb exposure induces hepatic metabolism disorder associated with gut microbiota dysbiosis in adult male zebrafish. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51(1): 88-96. https://doi.org/10.1093/abbs/gmy153

ÖZGEÇMİŞ

ÖZLEM SAYGIN

ozlemsaygin07@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2015-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Doktora 2003-2009	Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği, Ankara
Yüksek Lisans 2000-2003	Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği, Ankara
Lisans 1996-2000	Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği, Kırşehir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Biyoloji Öğretmeni 2018- Devam ediyor.	Erünal Sosyal Bilimler Lisesi, Döşemealtı-Antalya
Biyoloji Öğretmeni 2015- 2018	Serik Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi, Serik-Antalya
Biyoloji Öğretmeni 2006-2015	Dolapoğlu Anadolu Lisesi, Selçuklu-Konya

Sınıf Öğretmeni 2002-2006	Tavşançalı Atatürk İlköğretim Okulu, Kulu-Konya
Sınıf Öğretmeni 2000-2002	Acıkuyu İlköğretim Okulu, Kulu-Konya

ESERLER

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Saygın, Ö., Atılboz, N.G. ve Salman, S. (2006). Yapılandırmacı Öğretim Yaklaşımının Biyoloji Dersi Konularını Öğrenme Başarısı Üzerine Etkisi: Canlılığın Temel Birimi – Hücre. *GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 26, 1, 51-64.*

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Saygın, Ö., Atılboz, N.G. ve Salman, S. (2004). Yapılandırmacı Öğretim Yaklaşımının Lise 1.Sınıf Öğrencilerinin Hücre Konusunu Öğrenmeleri Üzerine Etkisi, 6.Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi, 9-11 Eylül 2004. İstanbul.

2- Saygın, Ö., Atılboz, N.G., Çakıroğlu J. ve Salman S. (2006). Öğrenme Halkası Modelinin İnsanda Dolaşım Sistemi Konusunu Öğrenme Başarısı Üzerine Etkisi, 7. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi, 7-9 Eylül 2006. Ankara.

3- Saygın, Ö., Çakıroğlu J., Atılboz, N.G. ve Salman S. (2008). Öğrenme Halkası Modelinin Nükleik Asitler ve Protein Sentezi Konusunu Öğrenme Başarısı Üzerine Etkisi. 8. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi, 27-29 Ağustos, 2008. Bolu.

4- Saygın, Ö., Atılboz, N.G. ve Salman S. (2009). The Effects Of Using Multiple Intelligences Theory And Learning Cycle To Teach Nucleic Acids And Protein Synthesis. ESERA 2009 Conference, 31 August-4 September, 2009. Istanbul/Turkiye.

5- Saygın, Ö., Atılboz, N.G. (2017). Lise Öğrencilerinin Organ Bağışı Hakkındaki Bilgi ve Görüşlerine Eğitimin Etkisi. World Congress on Educational and Instructional Studies, 26-28 October 2017, Antalya/Turkiye.

6- Yalçın, B., Güneş, M., Saygın, Ö., Kaya, B. (2018) Drosophila SMART Yöntemi ile Fungusitlerin (Metiram, Kresoxim-methyl ve Hymexazol) Genotoksisitlerinin Araştırılması. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 April 2018, Ankara/Turkiye.

7- Atılboz, N. G., Saygın, Ö. (2019) Tahmin/Tartışmaya Dayalı Öğrenme Halkası modelinin Motivasyon Üzerine Etkileri: Hayvanların Sınıflandırılması. 10. Uluslararası Eğitimde Yeni Yönelimler Kongresi, 26-27 Nisan 2019, Antalya/Turkiye.