

## Bazı Fungusitlerin Genotoksik Potansiyellerinin *Drosophila* SMART ve KOMET Yöntemleri ile Araştırılması

Ayşen Yağmur KURŞUN<sup>1</sup>, Merve GÜNEŞ<sup>1</sup>, Burçin YALÇIN<sup>1</sup>, Havva ERTUĞRUL<sup>1</sup>, Bülent KAYA<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 07070, Antalya, Türkiye

(Alınış / Received: 19.08.2021, Kabul / Accepted: 04.11.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2022)

### Anahtar Kelimeler

*Drosophila*,  
Fungusit,  
Genotoksosite,  
KOMET,  
SMART

**Özet:** Her yıl birçok yeni pestisit kullanım amacıyla üretilmektedir. Pestisitlerin önemli alt gruplarından biri olan fungusitler, tarımsal ürünleri fungal enfeksiyonlardan korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte fungusitlerin genotoksik potansiyelleri hakkındaki çalışmalar hala çok sınırlıdır. Bu çalışmada, yaygın kullanılan dört fungusit'in (metiram, kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol) genotoksik potansiyelleri *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ve *Drosophila* Tek Hücre Jel Elektroforezi Testi (*Drosophila* Komet Testi) kullanılarak araştırılmıştır. Son yıllarda genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *Drosophila*, insan genetik hastalıkları araştırmalarında, genetik ve moleküler yaklaşımların kullanılmasında güçlü bir sistem sağlamaktadır. Model organizma olarak *Drosophila* birçok açıdan insan sistemleri ile benzer yönler göstermektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre genotoksik etkisi SMART yöntemi ile araştırılan 4 fungusitin genotoksisiteyi indüklediği tespit edilmiştir. KOMET deneyinde ise çalışılan fungusitlerin DNA tek iplik kırığına yol açtığı belirlenmiştir. Bu çalışma pestisitlerin insan sağlığı ve olası genetik hastalıklar üzerine potansiyel etkileri hakkında yeni veriler sunmaktadır.

## Investigation of Genotoxic Potentials of Some Fungicides by *Drosophila* SMART and KOMET Methods

### Keywords

*Drosophila*,  
Fungicide,  
Genotoxicity,  
KOMET,  
SMART

**Abstract:** Many new pesticides are produced for use every year. Fungicides, one of the important subgroups of pesticides, are used to protect agricultural products from fungal infections. However, studies on the genotoxic potential of fungicides are still very limited. In this study, the genotoxic potentials of four commonly used fungicides (metiram, kresoxim-methyl, propamocarb and hymexazol) were investigated using the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the *Drosophila* Single Cell Gel Electrophoresis Test (*Drosophila* Comet Test). *Drosophila*, which has been widely used in genetic studies in recent years, provides a powerful system in the use of genetic and molecular approaches in human genetic diseases research. As a model organism, *Drosophila* is in many ways similar to human systems. According to the results obtained from the study, it was determined that 4 fungicides whose genotoxic effects were investigated by SMART method did not induce genotoxicity. In the KOMET experiment, it was determined that the studied fungicides caused DNA single strand breakage. This study provides new data on the potential effects of pesticides on human health and possible genetic diseases.

### 1. Giriş

Nüfusun sürekli artışı nedeni ile yeni yerleşim alanları açılmakta ve bu nedenle kullanılabilir tarım alanları da giderek azalmaktadır. Artan nüfus ve daralan tarım alanları nedeniyle bu alanlardan maksimum verimin alınması gerekmektedir. Bu bağlamda, ürün verimini

arttırmak için tarım ürünleri çok sayıda pestisit vb. kimyasala maruz kalmaktadır [1]. Pestisitler, ev, işyerleri, hastaneler ve parklar dahil olmak üzere hemen hemen her kara ve su ortamında bulunabilen toksik kimyasallardır ve tarım işçisi olsun ya da olmasın her birey, dokunma, soluma, yeme ve içme gibi yollarla her gün çok sayıda pestisite maruz

\*İlgili yazar: bkaya@akdeniz.edu.tr

kalmaktadır [2]. Pestisitler, tarlada mahsul üretimi sırasında veya hasat sonrası muamelelerde haşereleri, bitki hastalıklarını ve yabancı otları kontrol etmek için yaygın olarak kullanılarak yüksek verim ve kaliteli tarımsal mahsullerin üretilmesini sağlamaktadır. Bu da kaçınılmaz olarak pestisitlerin mahsullerde ve çevrede birikmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, pestisit kullanımının bariz faydalarına rağmen kalıntılarının varlığından dolayı çevre ve gıda güvenliği sorunlarına ilişkin giderek artan endişeler vardır [3]. Son yirmi yılda yapılan araştırmaların çoğu, pestisitlerin su, toprak ve mahsullerde birikmesinin insan sağlığı ve ekosistemler üzerinde ciddi olumsuz etkilere sahip olabileceğini göstermiştir [4]. Günümüze kadar farklı kullanım amaçları için pek çok pestisit piyasaya sürülmüş ve bunlardan bazıları da gerekli testler yapılmadan uzun süre kullanılmıştır. Gerekli etkileri yeteri kadar kontrol edilmeden piyasaya sürülen gerekse yanlış kullanılan pestisitler, toprak kimyasının değişmesi, toprakların verimsizleşmesi ve pestisitlerin kullanıldığı bitki ve hedef dışı organizmalarda bazı genetik bozuklukların oluşması gibi birçok olumsuz sonuçlar meydana getirebilmektedir [5-7].

Pestisitler istenmeyen organizmaları azaltmasına rağmen, yaygın ve kontrolsüz şekilde kullanımları çevrede kalıntı bırakarak büyük ölçüde çevre kirliliğine sebep olurken, insan sağlığı açısından da potansiyel risk oluşturmaktadır [8-10]. Pestisitlerin yüzey ve yer altı sularına, toprağa, hedef dışı organizmalara doğrudan, kalıntılar ya da kalıcı bileşikler nedeniyle bulaşmaları pestisitlerin istenmeyen etkilerinin temelini oluşturmaktadır [11]. Yapılan bazı çalışmalar pestisitlerin yüzey akışı yoluyla su ortamlarına girerek insan ve suda yaşayan organizmalar için toksik olabildiğini göstermiştir [12, 13].

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Pestisitler etki ettiği zararlı grubuna göre; insektisit, akarisit, nematit, rodentisit, fungusit, herbisit, bakterisit, algisit, repellentler vb. gibi çeşitli alt sınıflara ayrılabilir. Etki ettiği zararlı grubuna göre yapılan sınıflandırmada kullanım oranlarına göre en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir [1, 11].

Pestisitlerin büyük bir sınıfı olan fungusitler, birçok mantar hastalıkları ile mücadelede ve bitki hastalıklarını önlemek için kullanılmaktadır. Tarımda fungusitler, kök, sebze ve meyvelerin depolanması sırasında ya da süs bitkileri, ağaçlar, tarla ürünleri, tahıl ve çim bitkilerine doğrudan uygulanmaktadır [14, 15]. ABD'de 2012 yılı verilerine göre bilinen pestisit sayısı 67000'dir. Bunlardan 3600'den fazlasının ise fungusit olduğu kaydedilmiştir [16].

Günümüzde hızlı nüfus artışının getirdiği en büyük sorunlardan biri de beslenme problemleridir. Bu problemin çözümü için var olan tarım alanlarını korumak ve mevcut tarım alanlarından maksimum düzeyde ürün almak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında fungusitler, bitkileri mantar ve mantar hastalıklarından korumak için kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasal maddelerin su, toprak, bitki ve atmosferde bıraktığı kalıntılar besin zinciri yoluyla çevreyi olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda hayvanlar da fungusitlere gerek beslenme sırasında gerekse solunum ya da deri yolu ile maruz kalarak zarar görebilmektedir [14]. Her yıl çiftlik hayvanları fungusit uygulanmış ürünlerden kazayla da olsa zehirlenmektedir. Bazı hayvanlar fizyolojileri ve davranışları sebebiyle fungusit zehirlenmesinde diğer hayvanlara göre daha hassas olabilmektedir. Örneğin bakır sülfat, tiram, klorotalonil ve captan özel olarak balıklarda ve arılarda toksik etki yaratmaktadır. Ayrıca yabancı kuşlar da tarlalara ekilen fungusitli tohumlardan zehirlenebilmektedir [15]. İnsanlar ise tarımsal alanda kullanılan birçok fungusite gerek besinlerin kontaminasyonu ve gerekse depolama ve taşıma aşamasında ürünün funguslardan korunması amacıyla kullanılan fungusitler nedeni ile yoğun olarak maruz kalmaktadır [17].

Türkiye, son yıllarda dünyanın toplam sebze üretiminin %70'inden fazlasını oluşturarak en büyük yaş meyve ve sebze üreticilerinden biri haline gelmiştir [18]. Bu üretime bağlı olarak ülkemizde de tarımsal faaliyetin sürekliliğini sağlamak amacıyla pestisitlerin yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada ülkemizde tarımsal alanda fungus mücadelesinde yaygın kullanıma sahip olan metiram, kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazolün genotoksik potansiyelleri *in vivo* *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ve *Drosophila* Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (KOMET) yöntemleriyle çalışılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. *Drosophila melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

*Drosophila* SMAR yöntemi, *Drosophila* kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimler sonucu heterozigotluğun kaybolması ve farklılığın fenotipte gözlenmesi esasına dayandığı ve nokta mutasyon, delesyon, kromozomlarda ayrılmama ve rekombinasyon gibi birçok genetik sonucun belirlenebildiği bir test sistemidir [19]. Bu çalışmada, normal metabolik aktiviteye sahip *mwh* / *mwh* ve *flr<sup>3</sup>* / *TM3, Bd<sup>S</sup>* bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Yapılan çaprazlamalar aşağıdaki gibidir.

$$\text{♀ } flr^3 / TM3, Bd^S \times \text{♂ } mwh / mwh \quad (1)$$

Kuru halde bulunan *Drosophila* hazır besininin (*Drosophila* Instant Medium) yaklaşık 4,5 gramı hazırlanan test edilecek madde derişimlerinin 9 mL'si ile ıslatılarak farklı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Bütün çalışmalar sabit sıcaklık ayarlı inkübatörde (25 + 1 °C) yapılmıştır. Uygulamalar sonunda elde edilen bireylerin kanat preparatları Graf vd (1984)'nin metoduna göre stereo mikroskop altında hazırlanmıştır [19]. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda 40X büyütmede incelenmiş ve elde edilen veriler Kaya (2000)'nin metoduna göre sınıflandırılarak bu test için kullanılan Microsta istatistik paket programı ile değerlendirilmiştir [9, 20].

## 2.2 Alkali tek hücre jel elektroforezi testi (KOMET)

KOMET testi, ökaryotik hücrelerde farklı bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, güvenilir ve hassas bir tekniktir ve genotoksitate çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır [21-28]. Bu çalışma kapsamında incelenecek olan fungusitlerin *Drosophila* hemositlerinde muhtemel DNA hasarı etkisi KOMET testi ile belirlenmiştir. *Drosophila* hemosit izolasyonu Irving vd. (2005)'nin metoduna göre gerçekleştirilmiştir [29]. Hücreler fosfat tamponu (PBS) ile süspanse edilerek düşük erime ısısına sahip agaroz (LMA) ile hızlı bir şekilde karıştırılmış ve normal erime ısısına sahip agaroz (NMA) ile kaplanmış lamlar üzerine yayılmıştır. Lamlar soğuk

plakada bekletilmiş ve sonrasında içerisinde lizing solüsyonu (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100 ve %1 N-lauroylsarcosine sodium salt solution, pH = 10) bulunan etrafı ışık almayan şalelere yerleştirilmiştir. Lizing işlemi sonrasında preparatlar elektroforez tankında bulunan solüsyon (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ve 300 mM NaOH, pH = 13) içerisine konularak burada 30 dakika beklemesi sağlanmıştır. Daha sonra, 25 V, 300 mA'de 30 dakika elektroforez yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforezden sonra lamlar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu (400 mM Tris buffer, pH = 7,5) bulunan şale içerisine alınmıştır. Her bir doz için *Drosophila* hemositlerinde 50 hücre 40X büyütmede Floresan (Nikon Eclipse E200) mikroskopta sayılarak deney tamamlanmıştır. Tüm ölçümler Comet-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde yapılmıştır.

## 3. Bulgular

### 3.1. SMART yönteminde normal metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* larvalarına propamocarb, metiram, hymexazol ve kresoxim-methyl uygulamaları

SMART ile genotoksik özellikleri değerlendirilen propamocarb, metiram, hymexazol ve kresoxim-methyl uygulamalarından elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu dört fungusitin genotoksik etkileri değerlendirilirken her bir derişim için, normal kanatlı bireylerden kanat preparatları hazırlanarak

**Tablo 1.** Normal metabolik aktiviteye sahip *Drosophila*'da Propamocarb, Metiram, Hymexazol ve Kresoxim-methyl dozlarının 72±4 saatlik SMART uygulamaları

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 klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
<b>Normal Kanat</b>																	
Distile Su	80	19	(0,24)	-	1	(0,01)	0	(0,00)	0	(0,00)	20	(0,25)	20	(0,25)	-	(1,02)	
4 mM EMS	10	78	(7,80)	+	47	(4,70)	+	5	(0,50)	+	123	(12,30)	+	130	(13,00)	+	(50,41)
<b>Propamocarb</b>																	
1	80	15	(0,19)	-	5	(0,06)	i	0	(0,00)	i	20	(0,25)	-	20	(0,25)	-	(1,02)
2	80	16	(0,20)	-	2	(0,02)	i	0	(0,00)	i	18	(0,22)	-	18	(0,22)	-	(0,92)
5	80	16	(0,20)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	17	(0,21)	-	17	(0,21)	-	(0,87)
10	80	17	(0,21)	-	0	(0,00)	i	1	(0,01)	i	18	(0,22)	-	18	(0,22)	-	(0,92)
<b>Metiram</b>																	
1	80	13	(0,16)	-	4	(0,05)	i	2	(0,02)	i	19	(0,24)	-	19	(0,24)	-	(0,97)
2	80	17	(0,21)	-	4	(0,05)	i	2	(0,02)	i	22	(0,28)	-	23	(0,29)	-	(1,13)
5	80	21	(0,26)	-	3	(0,04)	i	1	(0,01)	i	25	(0,31)	i	25	(0,31)	i	(1,28)
10	80	16	(0,20)	-	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	19	(0,24)	-	19	(0,24)	-	(0,97)
<b>Hymexazol</b>																	
1	80	21	(0,26)	-	2	(0,02)	i	0	(0,00)	i	23	(0,29)	-	23	(0,29)	-	(1,18)
2	80	16	(0,20)	-	4	(0,05)	i	2	(0,02)	i	22	(0,28)	-	22	(0,28)	-	(1,13)
5	80	19	(0,24)	-	2	(0,02)	i	0	(0,00)	i	22	(0,28)	-	22	(0,28)	-	(1,13)
10	80	19	(0,24)	-	6	(0,08)	i	1	(0,01)	i	26	(0,32)	i	26	(0,32)	i	(1,33)
<b>Kresoxim-methyl</b>																	
1	80	14	(0,18)	-	0	(0,00)	i	1	(0,01)	i	15	(0,19)	-	15	(0,19)	-	(0,77)
2	80	15	(0,19)	-	4	(0,05)	i	0	(0,00)	i	18	(0,22)	-	19	(0,24)	-	(0,92)
5	80	15	(0,19)	-	3	(0,04)	i	2	(0,02)	i	20	(0,25)	-	20	(0,25)	-	(1,02)
10	80	20	(0,25)	-	3	(0,04)	i	1	(0,01)	i	24	(0,30)	i	24	(0,30)	i	(1,23)

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif (genotoksik); -, negatif (genotoksik değil); i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi=0.05.

incelenmiştir. Bu çalışmada her bir doz için 80 kanat mikroskop altında incelenmiştir. Negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasında, preparatı yapılan 80 kanatta 19 adet küçük tek tip klon, 1 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 20 adet klon belirlenmiştir. Toplam *mwh* klon sayısı ise 20 olarak bulunmuştur. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 1,02 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan etil metan sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucunda, distile su ile karşılaştırıldığında değerlendirmede kullanılan tüm klon tiplerinde istatistiksel önemde artış tespit edilmiştir.

Uygulaması yapılan fungusitlerin çalışılan tüm dozlarda (1, 2, 5 ve 10 mM) ve tüm parametreler açısından (küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon) kontrol grubu distile suya göre istatistiki açıdan pozitif sonuç gözlenmemiştir. Kresoxim-methylin küçük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametrelerinde doza bağlı olarak klon frekansında artış olduğu tespit edilmiştir ancak istatistiki açıdan öneme sahip değildir. Hymexazolün büyük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından en yüksek dozunda (10 mM) en fazla klon sayısına sahip olduğu ancak istatistiki olarak anlamlı sonuç göstermediği belirlenmiştir. Propamocarbın küçük tek tip klonların sayısında doza bağlı artış gözlenmiştir ancak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Metiram, büyük tek tip klon sayısında kontrol grubu olan distile suya göre artış göstermiş olsa da burada istatistiksel önemde bir fark bulunmamaktadır.

### 3.2 KOMET testinde propamocarb, metiram, hymexazol ve kresoxim-methyl uygulamasından sonra *Drosophila* hemositlerinde meydana gelen DNA hasarı

KOMET sonucuna göre pozitif kontrol grubu olan EMS uygulamasında tüm parametreler açısından (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) istatistiki olarak kontrol grubuna göre anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir.

Propamocarbın kuyruk uzunluğu parametresi açısından 2 mM haricindeki dozlarda (1, 5 ve 10mM) pozitif sonuç gözlenmiştir. Metiramın sadece en yüksek dozunda (10 mM) kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti açısından istatistiki olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer dozlarda (1, 2 ve 5 mM) değerlendirilen tüm parametreler açısından kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda bir fark gözlenmemiştir. Hymexazolün 2, 5 ve 10 mM'lık uygulamalarında kuyruk uzunluğu bakımından istatistiki olarak anlamlı pozitif sonuç gözlenmiştir. 1 mM'lık uygulamasında ise kuyruk momenti bakımından istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki saptanmıştır. Bunun yanında kuyruk yoğunluğunda kontrole göre artış gözlenmiş olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kresoxim-methyl uygulama sonuçlarında ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi açısından 1, 2 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda anlamlı pozitif sonuç elde edilmiştir. Ayrıca kuyruk yoğunluğunda kontrol grubu olan distile suya oranla artış yaşansa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** KOMET testinde *Drosophila* hemositlerinde Propamocarb, Metiram, Hymexazol ve Kresoxim-methyl uygulamasından sonra meydana gelen DNA hasarı

	Kuyruk Uzunluğu (µm)#	Kuyruk Yoğunluğu (%)#	Kuyruk Momenti (µm)#
Distile Su	42,38 ± 1,96	18,38 ± 2,81	2,55 ± 0,39
4 mM EMS	80,90 ± 4,05***	31,47 ± 2,56*	8,35 ± 1,19***
<b>Propamocarb</b>			
1 mM	56,8 ± 1,34**	22,55 ± 2,20	4,78 ± 0,55
2 mM	44,16 ± 2,18	16,69 ± 2,17	3,20 ± 0,45
5 mM	56,84 ± 1,70**	21,98 ± 2,46	4,31 ± 0,58
10 mM	60,28 ± 2,09***	18,28 ± 2,14	3,35 ± 0,43
<b>Metiram</b>			
1 mM	46,02 ± 2,19	13,28 ± 1,83	2,45 ± 0,38
2 mM	47,50 ± 1,75	23,04 ± 2,56	3,34 ± 0,34
5 mM	44,32 ± 1,46	18,83 ± 2,41	2,78 ± 0,37
10 mM	69,54 ± 1,92***	17,59 ± 2,49	7,34 ± 0,87***
<b>Hymexazol</b>			
1 mM	52,76 ± 1,83	27,65 ± 3,13	5,54 ± 0,63*
2 mM	62,46 ± 3,43***	20,48 ± 3,01	3,88 ± ,51
5 mM	57,50 ± 2,22***	25,10 ± 2,92	4,65 ± 0,52
10 mM	55,82 ± 2,09**	21,67 ± 2,82	4,31 ± 0,48
<b>Kresoxim-methyl</b>			
1 mM	56,06 ± 2,17**	20,14 ± 2,54	4,46 ± 0,62
2 mM	60,24 ± 2,22 ***	21,33 ± 2,58	3,78 ± 0,40
5 mM	52,96 ± 2,71	16,83 ± 2,13	3,34 ± 0,56
10 mM	54,24 ± 1,68*	19,32 ± 2,96	3,36 ± 0,57

\* 0,01 < p < 0,05; \*\* 0,001 < p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

# Deneyden elde edilen ortalama ± standart hata (deney setinde her doz için toplam 50 hücre sayılmıştır)

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Fungusitler evsel, tarımsal ve endüstriyel alanlarda tarımsal ürünlerin yetiştirilmesi, depolanması ve taşınması gibi farklı alanlarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında iç mekânlarda fungus kontrolünde de kullanım alanları bulunmaktadır. Fungusitlerin tarımsal alanda kullanımı, bitkilere etki eden mantarların gelişimini engelleyerek hastalıkların oluşmasını engellemektedir [30]. Ticari tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde hastalık ve zararlılarla mücadele önemli kültürel işlemlerin arasında yer almaktadır. Hasatı yapılan ürünlere çeşitli mantar hastalıklarını önlemek amacıyla kontakt veya sistemik etkili fungusitler kullanılmaktadır [31].

Fungusitlerin etki mekanizmaları ve metabolize edilişleri farklı olduğundan insanlar ve diğer hedef dışı canlılar tarafından sindirilen maddeler teratojenik, mutajenik ve karsinojenik gibi farklı etkiler yaratabilmektedir [32,33]. Tarımda, depolamada ve ürün işleme sırasında kullanılan fungusitler düşük toksik değerlerde olduğu kadar hayvanlar için öldürücü dozlara kadar da çıkabilmektedir. Yaşam alanlarında fungusitlerin yanlış kullanımı, kaza ve dikkatsizlikler çiftlik hayvanları ile evcil hayvanlar için tehlike oluşturmaktadır [15].

Literatürdeki pestisit çalışmalarının büyük çoğunluğunu insektisit ve herbisit araştırmaları oluşturmaktadır. Ancak fungusitlerin yaygın kullanımına rağmen fungusitlerin farklı etkilerine ilişkin çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunların içindeki genotoksikite çalışmaları da oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, ülkemizde de yaygın kullanılan dört fungusit'in (metiram, kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol) genotoksik potansiyelleri *Drosophila* SMART ve KOMET yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

*Fusarium*, *Aphanomyces*, *Pythium* ve *Corticium spp.*'nin neden olduğu hastalıkların kontrolü için dünya çapında sistemik bir toprak ve tohum fungusiti olarak kullanılmakta olan hymexazol, mücadele edilen fungusun DNA ve RNA sentezini bozarak etkisini göstermektedir [34]. Wu vd. (2005) çalışmalarında insan hepatoma hücre hattı (HepG2)'nda hymexazol ile birlikte oxazole fungusitler grubunda bulunan vinclozolinin genotoksik etkilerini Mikronükleus (MN) testi ile araştırmışlardır. Çalışmada 24 saatlik uygulama sonucunda 50, 100, 200 ve 400  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda genotoksik etki gözlenmemiştir. Bunun yanında 400  $\mu\text{M}$ 'lık dozda sitotoksikite tespit edilmiştir [35]. Sanchez-Argüello vd. (2012) *Physella acuta*'da vinclozolinin embriyo toksisitesi ve genotoksik etkilerini araştırmıştır. Vinclozolin düşük embriyo toksisitesi göstermiş bunun yanında yapılan mikronükleus analizlerinde çalışılan iki dozdan (5 ve 10 mg/L) düşük olanı genotoksik etki göstermiştir [36]. Hymexazolün güvenliği üzerine kapsamlı

çalışmalar da bu bileşiğin toksisitesinin düşük olduğunu ortaya koymuştur. 90 günlük besleme çalışmaları ile hymexazolün subakut toksisite etki düzeyleri ratlar için 1800 ppm (130 mg/kg/gün)-5000 ppm (300 mg/kg/gün) ve farelerin 2500 ppm (375 mg/kg/gün) olarak gösterilmiştir. 2 yıllık besleme çalışmaları ile hymexazolün kronik toksisite etki düzeyleri sıçanlar için 300 ppm (20mg/kg/gün) ve beagle köpekleri için 15 mg/kg/gün olarak gösterilmiştir. Teratojenite ve üç nesil üreme çalışmalarında sırasıyla 180 ppm-1800 ppm'e kadar olan diyet düzeylerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Mikroorganizmalarla yapılan mutajenez çalışmasında yüksek konsantrasyonlarda bile negatif sonuç gözlenmiştir. Hymexazolün kuşlara ve balıklara yönelik etkileri önemsizdir [37]. Çalışmamızda SMART deneyinden elde ettiğimiz verilere göre hymexazolün *Drosophila* SMART deneyinde genotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Büyük tek tip ve küçük tek tip klonlarda meydana gelen artışında önemsiz istatistiksel değerlere sahip olan hymexazol, küçük tek tip, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametrelerinde de genotoksikite yaratmamıştır. Ancak DNA tek iplik kırıklarının belirlendiği KOMET deneyinde kuyruk uzunluğu parametresinde hymexazol tüm dozlarında kontrol grubuna göre yüksek genotoksikiteyi indüklediği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar daha önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında farklı mekanizmaya sahip farklı test sistemlerinde farklı sonuçlar gözlenebildiğini göstermektedir. Bu çalışmada da mekanizmaları farklı iki test kullanılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlamda genotoksikite çalışmalarının farklı test sistemleri ile daha geniş bir spektrumda değerlendirilmesi gerektiğini göz önüne sermektedir.

İlk geniş spektrumlu strobilurin fungusit olarak bilinen kresoxim-methyl, *Ascomycete*, *Basidiomycete* ve *Oomycete* patojenlerinin neden olduğu geniş bir hastalık yelpazesini kontrol etmek için koruyucu bir fungusit olarak kullanılmaktadır. Etkilerini fungal hastalık patojeninin mitokondri iç zarında yer alan Kompleks III üzerinde göstererek mitokondriyal elektron taşımının engellemeleriyle göstermektedirler [38]. Lee vd.'leri kresoxim-methyl uygulaması yapan kişilerde dermal ve solunum yoluyla hangi oranda bu fungusite maruz kaldıklarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda fungusit uygulaması yapan bireylerde en çok maruziyetin ön kol (%35,5), göğüs ve karın (%30,2) ve ellerde (%17,9) gerçekleştiğini tespit etmişlerdir ve bu durum bizlere kresoxim-methyl fungusiti uygulayan tarım işçilerinin bünyelerine oldukça fazla fungusit aldıklarını göstermektedir [39]. Cui vd. (2017) çalışmasında *Daphnia magna*'ya karşı 3 strobilurin fungusidinin (kresoxim-methyl, pyraclostrobin ve trifloxystrobin) akuatik toksisitesini araştırmışlardır. Yenidoğanda 48 saatlik %50 etkin konsantrasyonunun (EC50) değerlerinin kresoxim-methyl, pyraclostrobin, ve trifloxystrobin için sırasıyla

443,3 mg/L, 20,9 mg/L ve 23,0 mg/L olduğunu göstermişlerdir. 3 strobilurin, *D. magna*'daki önemli detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesini önemli ölçüde indüklemiştir. 3 strobilurin, *D. magna* embriyolarına karşı daha yüksek toksisite göstermiştir. 48 saatlik EC50, sırasıyla, kresoxim-methyl, piraklostrobin ve trifloxistrobin için 157,3 mg/L, 3,9 mg/L ve 1,7 mg/L olarak bulunmuştur. Strobilurinlerin, subletal konsantrasyonlarında *D. magna*'nın çoğalmasını, gelişimini ve büyümesini önemli ölçüde etkileyebileceğini ortaya koymaktadır [40]. Flampouri vd. (2016) sitokrom bc1 inhibitörü olan strobilurin fungusiti kresoxim-methylin memeli renal hücre hattının redoks dengesini araştırmışlardır. Kresoxim-methylin sub-nefrotoksik konsantrasyonlarına memelilerin maruz kalması sonucunda ortaya çıkabilecek toksisitenin hücresel ve biyokimyasal mekanizmalarını araştırmak için, fibroblast benzeri renal Vero hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve özellikle oksidatif stres, mitokondriyal solunum fonksiyonları ve apoptoz ile ilgili çeşitli parametreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Mitokondriyal süperoksit oluşumunun yükselmesi mitokondriyal transmembran potansiyelindeki azalma ile birlikte mitokondriyal disfonksiyonu ortaya koymuştur. Antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH azalması, artmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve nitrit salınımı ile birlikte, oksidatif stres ve hücresel göçü indüklemiştir. Hücre içi kalsiyumun yükseltilmesi de gözlemlenirken, apoptoz için deneysel bir kanıt bulunmamıştır [41]. Ayrıca N2a hücreleri (fare nöroblastom hücre hattı) üzerinde kresoxim-methyl maruziyeti etkisini bir önceki çalışmaya benzer şekilde mitokondriyal süperoksit oluşumunda artış ve mitokondriyal transmembran potansiyelinde azalma ile gösterdiği tespit edilmiştir [42]. Regueiro vd. (2015) çalışmalarında 9 fungusitin (kresoxim-methyl, ametocradin, boscalid, cyazofamid, dimethomorph, fenhexamid, mepanipyrim, metrafenone ve pyraclostrobin) primer kültüre edilmiş kortikal nöronlar üzerindeki toksisitesini araştırmışlardır. 7 gün 0,1-100 µM konsantrasyonlarda *in vitro* maruziyet sonucunda MTT hücre canlılık testinde doza bağımlı toksisite gözlenmiştir. Kresoxim-methyl ve pyraclostrobin, hücre içi kalsiyumda [Ca<sup>2+</sup>] hızlı bir yükselmeye ve mitokondriyal zar potansiyelinin güçlü depolarizasyonuna neden olan en nörotoksik bileşiklerdir. Mitokondriyal solunum kompleksi III'ü engelleyerek etki edenler (Cyazofamid, Kresoxim-methyl ve Pyraclostrobin), daha yüksek toksisite seviyelerini göstermiştir [43].

Liu vd. (2013) çalışmalarında, Çin'de en önemli su ürünleri yetiştirme türlerinden olan ot sazanının (*Ctenopharyngodon idella*) erken yaşam aşamasında, üç ortak strobilurin türevi üç fungusitin (trifloxystrobin (TFS), azoxystrobin (AZ) ve kresoxim-methyl (KM)) akut toksisitesini değerlendirmişlerdir. Gelişmekte olan bireylerde normal gelişim parametreleri (LC50 ve ortalama kalp hızı), ilişkili genlerin ifadesi ve üç antioksidan enzim aktivitesi 48

saat boyunca kaydedilmiştir. Yapılan çalışmada, bu üç fungusitin, katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) aktivitesini arttırdığı ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azalttığı, üç büyümeyle ilişkili genin (IGF-1, IGF-2 ve GHR) ifadelerini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile *C. idella*'nın erken gelişimi üzerine TFS, AZ ve KM'nin potansiyel toksik etkileri ortaya konmuştur [44]. Liu vd., (2018) *Chlorella vulgaris* algi üzerinde kresoxim-methyl maruziyetinin genotoksik etkisini incelemek üzere yaptıkları KOMET deneyi sonucunda kresoxim-methyl fungusitinin genotoksik potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir [45]. Yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; kresoxim-methyl ile yapılan SMART deneyinde bu fungusitin tüm parametrelerde kontrol grubuna göre genotoksisiteyi istatistiksel önemde indiklemediği tespit edilmiştir. KOMET deneyinden elde edilen sonuçlara bakıldığında ise çalışılan bu fungusitlerin istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu etkinin doz artışına bağlı olmadığı gözlenmiştir. KOMET deneyi ile tespit edilen kuyruk uzunluğu en fazla 2 mM'lık dozda, bunu takiben 1, 10 ve 5 mM'lık dozlarda saptanmıştır. Bu deneyde ölçülen diğer parametreler kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinde ise istatistiksel önemde kontrol grubundan farklı olmadığı belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında kresoxim-methylin oksidatif hasara neden olduğu, antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve yarattığı genotoksik etkinin de ROS (Reaktif oksijen türleri) kaynaklı olabileceği gözlenmektedir. ROS kaynaklı genetik hasarın gözlenebildiği KOMET deneyinde elde edilen sonuçlar bu bilgilerle paralellik göstermektedir ancak hasarı meydana getiren mekanizmaların tespiti için ayrıntılı ek çalışmalar gerekmektedir.

Ditiokarbamat grubu fungusitler, bileşimlerinde yer alan nitrojen atomuna bağlanan reaktif bir hidrojen atomu nedeniyle mantar hücreleri üzerine etki etmeden önce alt bileşiklere dönüştürülmektedirler. Bir ditiokarbamat fungusiti olan metiramın biyotransformasyonu ile oluşan toksik bir alt bileşik olan etilentiyoür'ün (ETU) oluştuğu ve bu şekilde fungi üzerinde etki gösterdikleri bilinmektedir [46]. İmmünitenin elemanları olan doğal öldürücü hücreler (Natural Killer Cells) üzerinde yapılan bir çalışmada metiram fungusitinin bu hücrelerin tümör hücrelerini parçalama kabiliyetleri üzerinde etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda metiramın insan doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarına zarar verdiği tespit edilmiştir [47]. Sakr ve Shalaby (2012) çalışmalarında hamile albino farelerde metiramın histolojik ve histokimyasal etkilerini değerlendirmek için gebeliğin 2. gününden 19. gününe kadar metiramın oral uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda metiramın hepatik doku ve böbrek korteksinde birçok histolojik ve histokimyasal değişikliklere neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Hamile farelerin karaciğerinde ve böbreklerinde metiram ile gözlemlenen histolojik ve histokimyasal

değişikliklerin antioksidanların tükenmesi ve lipit peroksidasyonunun yükselmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [48]. Charles vd. (2000) metiramın subkronik ve kronik toksisitesi ve kanserojen potansiyelini araştırmışlardır. Kronik karsinojenite rat çalışmasındaki dozlar 0, 5, 20, 80 veya 320 ppm olarak, fare çalışmasındaki diyetler 0, 100, 300 veya 1000 ppm dozlarında 89 hafta (dişiler) veya 95 hafta (erkekler) olarak uygulanmıştır. Her iki türde kanserojen yanıt gözlenmemiştir. Sıçanlarda ve farelerde yapılan subkronik araştırmalarda hedef organ olarak tiroid araştırılmıştır. Sıçan çalışmasında 0, 5, 80, 320 veya 960 ppm'lik dozlar kullanılmış ve NOAEL [No Observed Advers Effect Level (Deney Hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz)] değeri 80 ppm olarak bulunmuştur. Subkronik fare çalışmasında, 0, 300, 1000, 3000 veya 7500 ppm içeren diyetler kullanılmıştır ve NOAEL değeri 300 ppm tespit edilmiştir. Özetle, bu çalışmaların bulguları, kemirgenlerde metiramın toksisitesini ortaya koymaktadır [46]. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre metiram SMART deneyinde genotoksik etki göstermemiştir. Büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar parametrelerinde meydana gelen hafif artış ise istatistiksel öneme sahip değildir. KOMET deneyinde elde edilen sonuçlara baktığımızda metiramın en yüksek dozu olan 10 mM hem kuyruk yoğunluğu hem de kuyruk momentinde istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarına neden olmuştur. Çalışılan diğer dozlarda ve kuyruk yoğunluğunda meydana gelen hasar doza bağlı veya istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bir karbamat fungusiti olan propamocarbın *Pythium spp.*, *Peronospora spp.*, *Phytophthora spp.*, *Bremia spp.* ve *Pseudoperonospora spp.* dahil olmak üzere çeşitli oomycetes mantarlarının gelişimindeki tüm aktif büyüme aşamalarını inhibe ederek etkilerini gösterdikleri bilinmektedir [49]. Propamocarbın erkek yetişkin farelerdeki nörotransmitter salgısı ve davranış üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada propamocarb maruziyetinin lokomotor aktivite üzerinde bozukluğa ve nörotoksisiteyi indüklemeye potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir [50]. Zebra balıkları üzerinde propamocarb maruziyetinin araştırıldığı bir başka çalışmada da benzer şekilde propamocarb maruziyetinin gelişim, lokomotor aktivite ve oksidatif stres üzerinde negatif etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir [4]. Aydemir ve Bilaloğlu (2004) fenarimol ve propamocarbın genotoksik etkilerini Swiss albino farelerde kemik iliğinde mikronukleus ve kromozom sapmaları testleri ile araştırmışlardır. Farelere intraperitoneal olarak dört farklı doz (50, 100, 200 ve 400 mg/kg vücut ağırlığı) fenarimol ve propamocarb enjekte etmişlerdir. Fenarimolün 24, 36 ve 48 saatlik uygulamadan sonra MN'de belirgin bir artış oluşturmadığı ve kromozom sapmalarının sayısını önemli ölçüde arttırmadığı, ancak yüksek dozlarda mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir (P<0,05). Propamocarbın ise MN

sıklığını artırmazken, tüm örnekleme aralıklarında polikromatik/normokromatik eritrosit oranını azalttığını saptamışlardır. Propamocarb, negatif kontrol grubuna kıyasla mitotik indeksi düşürdüğü saptanmıştır (P<0.001). Bu sonuçlara katkıda bulunarak, fenarimol ve propamocarbın, *in vivo* fare kemik iliğinde genotoksik değil, fakat sitotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır [51]. Falfushynska vd. (2013) çalışmalarında fungusit karışımı (propamocarb ve mankozeb karışımı, 91 µg/L-1)'nin tatlı su midyelerinin üzerindeki etkisini araştırmışlardır. İki farklı bölgeye [kirli (A) ve kirlenmemiş (F)] ait çift kabuklu *mollusca Anodonta anatina* fungusit karışımına 14 gün maruz bırakılmıştır. MN ve nükleer anormalliklerin seviyeleri, her iki bölgedeki kontrol grubu midyelerinde benzer şekilde düşükken (yaklaşık %2) uygulama sonrasında 4-5 kat arttığı belirlenmiştir. Her iki maruz kalmış grupta da DNA zincir kırılma seviyesi de yükselmiştir. Oksiradikal konsantrasyonunun yükselmesi, A ve F bölgelerinde elde edilmiş olan önemli sonuçlardan bir tanesidir. Bu nedenle, maruz kalmanın bir sonucu olarak oksidatif hasarın indüklendiği doğrulanmıştır. Karbamat, kolinesteraz tükenmesine ve sitotoksisiteye neden olmamıştır. Ancak her iki bölgede de genotoksisite ve pro-oksidan etkiler açısından birbirine yakın yanıt vermiştir [52]. Çalışmamızda değerlendirilen bir diğer fungusit olan propamocarb SMART deneyinde tüm parametrelerde genotoksik etki göstermemiştir. Bunun yanında KOMET deneyinde kuyruk uzunluğunda 1, 5 ve 10 mM'lık propamocarbın DNA hasarına yol açtığı gözlenmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada KOMET sonuçlarındaki pozitif sonuçlar muhtemelen oksidatif hasar sonucu DNA tek iplik kırıkları oluşumuna neden olurken, SMART çalışmasında indüklenmiş bir genotoksisite gözlenmemiştir. SMART deneyi delesyon, nokta mutasyon ve kromozomlarda ayrılmama gibi daha farklı kriterler ile genotoksisiteyi değerlendirdiği için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Propamocarbın olası farklı genotoksik etkilerinin de belirlenmesi için farklı mekanizmaları ortaya koyabilen daha fazla test sistemleri ile değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında (Proje No: 116Z029) desteklenmiştir.

## Etik Beyanı/Declaration of Ethical Code

*Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.*

**Kaynakça**

- [1] Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S. 2010. Tarım İlaçları Kullanımı Ve Riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(2), 154-169.
- [2] Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Kurtdere, A. K., Chasan, T., Ok, E. S. 2020. Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110940.
- [3] Farha, W., El-Aty, A.A., Rahman, M. M., Shin, H. -C., Shim, J. -H. 2016. An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(12), 1-21..
- [4] Liu, X., Zhang, R., Jin, Y. 2020. Differential responses of larval zebrafish to the fungicide propamocarb: Endpoints at development, locomotor behavior and oxidative stress. *Science of the Total Environment*, 731, 139136.
- [5] Shelton, J. F., Hertz-Picciotto, I., Pessah, I. N. 2012. Tipping The Balance Of Autism Risk: Potential Mechanisms Linking Pesticides And Autism. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 944-951.
- [6] Kwasniewska, K., Gadzala-Kopciuch, R., Cendrowski, K. 2015. 2-Analytical Procedure For The Determination of Zearalenone in Environmental and Biological Samples. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, 45(2), 119-130.
- [7] Siegwart, M., Grailot, B., Lopez, C. B., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P.C., Lopez-Ferber, M. 2015. Resistance To Bio-Insecticides or How to Enhance Their Sustainability: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 6, 381.
- [8] Wang, J., Yang, H., Zhang, X., Huang, Y., Qin, W. C., Wen, Y., Zhao, Y. H. 2020. Evaluation of modes of action of pesticides to *Daphnia magna* based on QSAR, excess toxicity and critical body residues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111046.
- [9] Kaya, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 134s, Antalya.
- [10] Kaya, B., Marcos, R., Yanıkoğlu, A., Creus, A. 2004. Evaluation of the Genotoxicity of Four Herbicides in The Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster* Using Two Different Strains. *Mutation Research*, 557(1), 53-62.
- [11] Kubilay, B. 2013. Karbamatlı Pestisitlerden Carbaryl'in Tatlı Su İstakozlarında (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) Akut Toksik Etkisinin Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 57s, Ankara.
- [12] Cao, J., Wang, M., Yu, H., She, Y.G., Cao, Z., Ye, J. M., Abd El-Aty, A. M., Hacimuftuoglu, A., Wang, J., Lao, S. B. 2020. An overview on the mechanisms and applications of enzyme inhibition-based methods for determination of organophosphate and carbamate pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 7298-7315.
- [13] Wolmarans, N. J., Bervoets, L., Meire, P., Wepener, V. 2020. Current status and future prognosis of malaria vector control pesticide ecotoxicology and *Xenopus* sp. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 252, 131-171.
- [14] Gupta R. C. 2007. *Veterinary Toxicology: Basic And Clinical Principles* (1. Basım). Elsevier, Park Avenue South, New York, 1201s.
- [15] Carisse, O. 2010. Fungicides. InTech. Rijeka, Croatia, 538s.
- [16] Reilly T. J., Smalling K. L., Orlando, J. L., Kuivila K. M. 2012. Occurrence of Boscalid And Other Selected Fungicides in Surface Water and Groundwater in Three Targeted Use Areas in The United States, *Chemosphere*, 89, 228-234.
- [17] Brooks, G. T., Roberts, T. R. 1999. *Pesticide Chemistry And Bioscience*. UK: Royal Society Of Chemistry.
- [18] TÜİK (Turkish Statistical Institute) 2014. The summary of agricultural statistics. <http://tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi: 16.08.2021).
- [19] Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juan, H., Hall, C. B., Kale, P. G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6, 153-188.
- [20] Frei, H., Wurgler, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- [21] Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M., Dhawan, A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 19, 85-90.
- [22] Sidduque, H. R., Chowdhuri, D. K., Saxena, D. K., Dhawan, A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 20, 285-290.
- [23] Carmona, E. R., Guescheva, T., Creus, A., Marcos, R. 2011. Proposal of an in vivo Comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52, 165-169.



- [24] Carmona, E. R., Creus, A., Marcos, R. 2011. Genotoxic effects of two nickel compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 718, 33-37.
- [25] Carmona, E. R., Creus, A., Marcos, R. 2011c. Genotoxicity testing of two lead compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 724, 35-40.
- [26] Shukla, A. K., Pragma, P. Kar Chowdhuri, D. 2011. A modified alkaline Comet assay for *in vivo* detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, 726, 222-226.
- [27] Augustyniak, M.1, Gladysz, M.2, Dziwięcka, M2. 2016. The Comet assay in insects-Status, prospects and benefits for science. Mutation research. Reviews in Mutation Research, 767, 67-76.
- [28] Bajpayee, M., Kumar, A., Dhawan A. 2016. Chapter 1 : The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage. ss 3-64. Dhawan, A., Anderson, D., ed. 2016. The Comet Assay in Toxicology 2nd Edition. The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 590s.
- [29] Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., Meister, M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell Microbiology, 7, 335-350.
- [30] Akyl, D. 2006. Farklı Tipteki Fungisitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 92s, Afyonkarahisar.
- [31] Dülgeroğlu Y. 2012. Salamuralık Asma Yaprığı Üretiminde Fungisit Kalıntı Miktarı Üzerine Hasat Zamanı Ve Salamura Yöntemlerinin Etkisi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 43s, Tokat. (Yüksek Lisans Tezi) Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [32] Krieger, R. 1990. Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 3 Academic Press, 0123341604, New York, 1576s.
- [33] U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 1999. Reregistration Eligibility Decision (RED), Captan, EPA-738-R-99-015, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- [34] Ypema, H. 2003. Fungicides, Hymexazol. ss 572-573. Plimmer, R. J., Gammon, D. W., Ragsdale, N. N., ed. 2003. Encyclopedia of Agrochemicals Volume 2. Wiley-Interscience, Canada, 1004s.
- [35] Wu, X. -J., Lu, W. -Q., Roos, P. H., Mersch-Sundermann, V. 2005. Vinclozolin, A Widely Used Fungicide, Enhanced BaP-Induced Micronucleus Formation in Human Derived Hepatoma Cells By Increasing CYP1A1 Expression. Toxicology Letters, 159, 83-88.
- [36] Sanchez-Argüello, P., Aparicio, N., Fernandez, C. 2012. Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the fresh water snail *Physa acuta*: Single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene. Ecotoxicology and Environmental Safety, 80, 152-160.
- [37] Zweig, G. 1978. Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators: New and Updated Methods. Academic Press. New York, 611s.
- [38] Orth, A.B., Kuhn, P.J., Schmitt, M.R. 2003. Fungicides, Inhibitors of Mitochondrial Energy Production. ss 573-584. Plimmer, J.R., Gammon, D.W., Ragsdale, N.N., ed. 2003. Encyclopedia of Agrochemicals Volume 2. Wiley-Interscience, Canada, 1004s.
- [39] Lee, J., Kim, E., Shin, Y., Lee, J., Lee, J., Moon, J. -K., Choi, H., Maasfeld, W., Kim, J. -H. 2018. Whole body dosimetry and risk assessment of agricultural operator exposure to the fungicide kresoxim-methyl in apple orchards. Ecotoxicology and Environmental Safety, 155, 94-100.
- [40] Cui, F., Chai, T., Liu, X., Wang, C. 2017. Toxicity of Three Strobilurins (Kresoxim-Methyl, Pyraclostrobin, and Trifloxystrobin) on *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 36(1), 182-189.
- [41] Flampouri, E., Mavrikou, S., Mouzaki-Paxinou, A-C., Kintzios, S. 2016. Alterations of cellular redox homeostasis in cultured fibroblast-like renal cells upon exposure to low doses of cytochrome bc1 complex inhibitor kresoxim-methyl. Biochemical Pharmacology, 113, 97-109.
- [42] Flampouri, E., Theodosi-Palimeri, D., Kintzios, S. 2018. Strobilurin fungicide kresoxim-methyl effects on an cancerous neural cell line: oxidant/antioxidant responses and *in vitro* migration. Toxicology Mechanisms and Methods, 28, 709-716.
- [43] Regueiro, J., Olgun, N., Simal-Gandara, J., Sunol, C. 2015. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. Environmental Research, 140, 37-44.
- [44] Liu, L., Jiang, C., Wu, Z., Gong, Y., Wang, G. 2013. Toxic Effects of Three Strobilurins (Trifloxystrobin, Azoxystrobin And Kresoxim-Methyl) on mRNA Expression And Antioxidant Enzymes In Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Juveniles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 98, 297-302.
- [45] Liu, X., Wang, Y., Chen, H., Zhang, J., Wang, C., Li, X., Pang, S. 2018. Acute toxicity and associated mechanisms of four strobilurins in algae.

- Environmental Toxicology and Pharmacology, 60, 12-16.
- [46] Charles, J. M., Tobia, A., van Ravenzwaay, B. 2000. Subchronic and Chronic Toxicological Investigations on Metiram: The Lack of a Carcinogenic Response in Rodents. *Toxicological Sciences*, 54, 481-492.
- [47] Whalen, M. M., Loganathan, B. G., Yamashita, N., Saito, T. 2003. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chemico-Biological Interactions*, 145, 311-319.
- [48] Sakr, S. A., Shalaby, S. Y. 2012. Metiram-induced histological and histochemical alterations in liver and kidney of pregnant mice. *Life Science Journal*, 9(1), 71-76.
- [49] Buschhaus, H. 2003. *Fungicides, Carbamates*. ss 550-552. Plimmer, J. R., Gammon, D. W., Ragsdale, N.N., ed. 2003. *Encyclopedia of Agrochemicals Volume 2*, Wiley-Interscience, Canada, 1004s.
- [50] Zhang, Y., Jin, C., Wang, X., Shen, M., Zhou, J., Wu, S., Fu, Z., Jin, Y. 2018. Propamocarb exposure decreases the secretion of neurotransmitters and causes behavioral impairments in mice. *Environmental Toxicology*, 34, 22-29.
- [51] Aydemir, N., Bilaloğlu, R. 2004. The Investigation of The Genotoxic Effects of Fenarimol and Propamocarb in Mouse Bone Marrow *In vivo*. *Toxicology Letters*, 147, 1, 73-78.
- [52] Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Stoliar, O. B. 2013. *In situ* exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusk. *Ecotoxicology*, 22, 433-445.