

**T.C.  
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL ALANLARDA KULLANILAN BAZI  
PESTİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ALLİUM  
VE SMART YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Eylül 2023**



**T.C.  
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL ALANLARDA KULLANILAN BAZI  
PESTİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ALLİUM  
VE SMART YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Eylül 2023**

Prof Dr. Zübeyde KUMBIÇAK danışmanlığında Fahrettin Anıl Sırlıbaş tarafından hazırlanan "**Tarımsal Alanlarda Kullanılan Bazı Pestisitlerin Genotoksik Etkilerinin Allium ve SMART Yöntemleriyle İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../20..

### JÜRİ

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

### ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../20..

Doç. Dr. Cemal ÇARBOĞA  
Enstitü Müdürü

## TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)

(Fahrettin Anıl Sırlıbaş)

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince engin birikimi ile bana rehberlik eden, değerli görüşleri ve yönlendirmeleri ile çalışmalarına kıymetli destekler sunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK'a

Yol gösterici önerileri ve değerli katkıları için Sayın Doç. Dr. Ümit KUMBIÇAK'a

Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi laboratuvarlarını kullanmam hususunda bana kolaylık sağlayan Sayın Doç. Dr. Erman İSTİFLİ'ye

Kıymetli fikirleri ile bana destek olan laboratuvar çalışma arkadaşlarım doktora öğrencisi Şeyma CİVAN ve doktora öğrencisi Hatice POYRAZ'a

Nevşehir'de her zaman bir evim olduğunu bana hissettiren arkadaşım Saltuk Buğra ÖZTÜRK'e

Bu süreçte madden ve manen yanımda olan sabır ve anlayışla beni destekleyen babam Ali SIRLIBAŞ, annem Gönül SIRLIBAŞ ve kardeşim Arda SIRLIBAŞ'a; her zaman yanımda olan değerli eşim Melike'ye ve varlığı ile bana mutluluk veren canım oğlum Ali Uras'a teşekkürü bir borç bilirim.

**TARIMSAL ALANLARDA KULLANILAN BAZI PESTİSİTLERİN  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ALLİUM ve SMART YÖNTEMLERİ ile  
ARAŞTIRILMASI**

**(Doktora Tezi)**

**Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Eylül 2023**

**ÖZET**

Tarım arazilerinde kullanılan pestisitlerin rastgele ve aşırı dozda uygulanması, çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu sebeple pestisitlerin etki mekanizmalarının ve genotoksisite potansiyellerinin anlaşılması büyük bir öneme sahiptir. Bu amaçla, bu tez çalışması ile thiram ve methoxyfenozidin genotoksisite potansiyeli Allium ve Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Allium yönteminde soğan kök uçları pestisitlerin konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılmıştır. Süre sonunda kök uçlarından preparatlar hazırlanmış mikroskop altında mitotik indeks (Mİ) ve kromozom anomalileri (KA) tespit edilmiştir. Allium testi sonuçları, Thiram ve Methoxyfenozid konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak Mİ değerinin negatif kontrole kıyasla azaldığını göstermiştir. Negatif kontrolde Mİ %6,94 ± 0,43 iken bu değer thiramın en yüksek konsantrasyonu olan 1 g/L de %3,72 ± 0,35'e düştüğü kaydedilmiştir. Benzer şekilde, methoxyfenozid için negatif kontrolde belirlenen %7,28 ± 0,32 Mİ değeri, en yüksek konsantrasyon olan 0,002 mL/L uygulamasında %3,97 ± 0,47'ye düşmüştür. İki pestisit de düzensizlik, köprü oluşumu, vagrant, yapışıklık ve kutup kayması, multipolarite tipi kromozomal anomalilerinin oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir.

SMART yönteminde mwh erkek ve flr<sup>3</sup> virgin dişilerin standart çaprazlamasından elde edilen 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalar pestisitlerin belirlenen konsantrasyonları ile hazırlanan hazır besiyer ortamında pestisitlere maruz bırakılmıştır. Bu ortamda ergine gelen *Drosophila* kanatlarından preparatlar hazırlanarak klon indüksiyon frekansları ve farklı kanat trikomları değerlendirilmiştir. SMART deneyinde thiram ve methoxyfenozid konsantrasyonlarındaki artışın klon indüksiyon frekanslarında bir artışa neden olduğu kaydedilmiştir. Pestisitlerin, transheterozigot ergin bireylerin kanatlarında sıklıkla küçük tek tip klonlar az da olsa büyük tek tip klonlar ve ikiz klonların oluşumunu uyardığı kaydedilmiştir. Bulgular, Thiram ve Methoxyfenozid'in bitki ve hayvan sistemlerinde genotoksisite potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, pestisitlerin genotoksisite potansiyellerinin ayrıntılı şekilde anlaşılması ve bu potansiyelin çevresel etkileri üzerindeki olası sonuçlarının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi, tarım uygulamalarının sürdürülebilirliği ve insan sağlığının korunması açısından son derece kritik bir öneme sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, Pestisit, Allium, SMART

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK

**Sayfa Adeti:** 109



**An Investigation into the Genotoxic Effects of Pesticides Used in Agricultural Areas Using the Allium and SMART Methods.**

**(Phd. Thesis)**

**Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY**

**INSTITUTE OF SCIENCE**

**August 2023**

**ABSTRACT**

Random and excessive use of pesticides in agricultural lands can have detrimental effects on both the environment and human health. As a result, it is vital to comprehensively understand the mechanisms of action and genotoxicity potential of these chemicals. Therefore, this thesis aims to evaluate the genotoxicity potential of the Thiram and Methoxyfenozide pesticides using the Allium and Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) methods.

In the Allium method, onion root tips were exposed to pesticide concentrations for 24 hours. At the end of the duration, preparations were made from the root tips, and the Mitotic Index (MI) and Chromosome Aberrations (CA) were detected under a microscope. The results of the Allium test showed that the MI value decreased compared to the negative control as the concentrations of thiram and methoxyfenozid increased. In the negative control, the MI was  $6,94\% \pm 0,43$  while this value dropped to  $3,72\% \pm 0,35$  for the highest concentration of thiram, which was 1 g/L. Similarly, the MI value of  $7,28\% \pm 0,32$  determined for the negative control in the case of methoxyfenozid decreased to  $3,97\% \pm 0,47$  with the application of the highest concentration of 0,002 mL/L. It was observed that both pesticides promoted the formation of chromosomal anomalies of the irregularity, bridge formation, vagrant, stickiness, and pole shift, as well as multipolarity types.

In the SMART method,  $72 \pm 4$ -hour-old transheterozygous larvae obtained from the standard crossbreeding of mwh males and flr<sup>3</sup>virgin females were exposed to pesticides

in the prepared instant medium at predetermined concentrations. Preparations were made from the wings of *Drosophila* that emerged in this environment, and clone induction frequencies and different wing trichomes were evaluated. In the SMART experiment, an increase in the concentrations of thiram and methoxyfenozid was noted to result in an increase in clone induction frequencies. It was recorded that the pesticides stimulated the formation of small uniform clones, to a lesser extent large uniform clones, and twin clones in the wings of transheterozygous adult individuals. The findings indicated that thiram and methoxyfenozid have genotoxicity potential in plant and animal systems. Therefore, it is crucial for the sustainability of agricultural practices and the safeguarding of human health to have a thorough comprehension of the genotoxicity potential of pesticides and a comprehensive evaluation of their conceivable impact on environmental factors.

**Key words:** Genotoxicity, Pesticide, Allium, SMART

**Thesis Supervisor:** Prof. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK

**Page Number:** 109

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ .....	xiv
1.BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mutasyonlar .....	5
2.1.1. Kromozomal Mutasyonlar .....	6
2.1.1.1. Sayısal kromozomal mutasyonlar.....	6
2.1.1.2. Yapısal kromozom mutasyonları.....	7
2.1.2. Gen Mutasyonları .....	9
2.1.3. Mutajenler.....	11
2.1.3.1. Kimyasal mutajenler .....	11
2.1.3.2. Fiziksel mutajenler.....	12
2.2. Pestisitler.....	13
2.2.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	13
2.2.1.1. Etki şekline göre sınıflandırma:.....	13

2.2.1.2.	Etkiledikleri canlı türüne göre sınıflandırma .....	14	
2.2.1.3.	Kimyasal yapılarına göre sınıflandırma.....	17	
2.2.2.	Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri .....	20	
2.2.3.	Pestisitlerin çevre üzerindeki etkileri.....	21	
2.2.4.	Dünyada ve Türkiye’de pestisit kullanımı.....	22	
2.3.	Çalışmada Kullanılan Organizmalar ile İlgili Genel Bilgiler .....	24	
2.3.1.	<i>Allium cepa L.</i> .....	24	
2.3.2.	<i>Drosophila melanogaster</i> .....	25	
2.3.2.1.	<i>D. melanogaster</i> ’in genetik çalışmalardaki önemi .....	26	
2.3.2.2.	<i>Drosophila melanogaster</i> ’in hayat döngüsü.....	28	
2.4.	Genotoksisite Testleri .....	31	
2.5.	Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri .....	33	
2.5.1.	Allium test yöntemi .....	33	
2.5.2.	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Test Yöntemi (SMART).....	34	
2.6.	Çalışmada Kullanılan Pestisitler Hakkında Bilgiler .....	37	
<b>3. BÖLÜM</b>			
<b>MATERYAL ve METOD .....</b>			<b>40</b>
3.1.	Allium Test Yönteminde Kullanılan Kimyasallar .....	40	
3.2.	SMART Yönteminde Kullanılan Kimyasallar .....	41	
3.3.	<i>Drosophila</i> Kültür Stoklarının Devamlılığı İçin Standart Besiyer Hazırlanması .....	42	
3.4.	Allium Test Yönteminin Uygulanması.....	43	
3.4.1.	Genotoksik uygulama .....	43	
3.4.2.	Preparat hazırlama .....	44	
3.4.3.	Hazırlanan preparatların analizi.....	45	
3.5.	Kanat Mutasyon ve Rekombinasyon Testi .....	46	

3.5.1.	Flr <sup>3</sup> virgin dişi bireyler ile mwh/mwh Erkek Bireylerinin Çaprazlanması.....	49	
3.5.2.	Transheterozigot larvaların elde edilmesi .....	50	
3.5.3.	Transheterozigot larvaların pestisit uygulanan hazır besiyere aktarımı .....	50	
3.5.4.	Thiram ve Methoxyfenozid için kanat preparatlarının hazırlanması aşaması	52	
3.5.5.	Mutant klonların tespit edilmesi .....	55	
3.5.6.	Klon indüksiyon frekansının hesaplanması .....	59	
3.5.7.	Sonuçların analizi .....	60	
<b>4. BÖLÜM</b>			
<b>BULGULAR.....</b>			<b>62</b>
4.1.	Allium Test Yönteminde Elde Edilen Sonuçlar .....	62	
4.1.1.	Thiramın soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanması sonucu tespit edilen genotoksik etkiler .....	62	
4.1.2.	Methoxyfenozidin soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanması sonucu tespit edilen genotoksik etkiler .....	65	
4.2.	SMART Yönteminde Elde Edilen Sonuçlar .....	68	
4.2.1.	Thirama maruz bırakılan 72±4 saatlik mwh/flr <sup>3</sup> TM3, Bd <sup>S</sup> transheterozigot ergin bireylerin kanatlarının incelenmesi ile elde edilen sonuçlar .....	68	
4.2.2.	Methoxyfenozide maruz bırakılan 72 ± 4 saatlik mwh/flr <sup>3</sup> TM3, Bd <sup>S</sup> transheterozigot ergin bireylerin kanatlarının incelenmesi ile elde edilen sonuçlar .....	71	
<b>5. BÖLÜM</b>			
<b>SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>			<b>75</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>			<b>88</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>			<b>109</b>

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye'de pestisit kullanımının bölgelere göre dağılımı .....	23
Tablo 2.2. Thiram'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	37
Tablo 2.3. Methoxyfenozid'in fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	39
Tablo 3.1. SMART yönteminde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan hipotez tablosu .....	60
Tablo 4.1. Thiramın <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekanslarına etkileri .....	63
Tablo 4.2. Thiramın genotoksik etkileri .....	64
Tablo 4.3. 24 saatlik methoxyfenozid uygulamasının <i>A. cepa</i> kök hücrelerinde Mitotik İndeks ve Mitotik faz üzerindeki etkileri .....	66
Tablo 4.4. Methoxyfenozidin genotoksik etkileri .....	67
Tablo 4.5. Thiram uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/flr <sup>3</sup> (Normal kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları .....	70
Tablo 4.6. Thiram uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/TM3 Bds (Serrat Kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları .....	71
Tablo 4.7. Methoxyfenozid uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ flr <sup>3</sup> (normal kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları .....	73
Tablo 4.8. Methoxyfenozid uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ TM3 Bds (serrat kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları .....	74

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Organik klorlu pestisitlerin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.2.	Organik fosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.3.	Organik kükürtlü pestisitlerin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.4.	Karbamatlı pestisitlerin kimyasal yapısı .....	19
Şekil 2.5.	Piretroit grubu pestisitlerin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.6.	Türkiye’de kullanılan pestisit türleri ve kullanım yüzdeleri .....	23
Şekil 2.7.	<i>Drosophila melanogaster</i> ’in yaşam döngüsü.....	28
Şekil 2.8.	İmajinal disk hücreleri tarafından oluşturulan <i>Drosophila melanogaster</i> vücut yapıları .....	30
Şekil 2.9.	<i>D. melanogaster</i> ergin bireylerde cinsiyet ayrımını sağlayan yapılar (a. Erkek birey, b. Dişi birey).....	31
Şekil 2.10.	SMART yönteminde tek tip ve ikiz klonların oluşum mekanizması .....	35
Şekil 2.11.	Normal ve Serrat (Testere Dişli) Kanatların Gösterimi .....	36
Şekil 2.12.	Thiramın açık kimyasal formülü .....	37
Şekil 2.13.	Methoxyfenozid’in açık kimyasal formülü .....	39
Şekil 3.1.	Pestisitlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan soğan kök uçları .....	44
Şekil 3.2.	Marker genlerin 3. Kromozom üzerindeki konumları.....	47
Şekil 3.3.	SMART yönteminin basamakları.....	48
Şekil 3.4.	Standart besiyer ile hazırlanan flr <sup>3</sup> /mwh çaprazlama şişeleri.....	50
Şekil 3.5.	72 ± 4 saatlik transheterozigot larvaların pestisit konsantrasyonları ile muamele edilen hazır besiyerlerin bulunduğu plastik kaplara aktarımı .....	52
Şekil 3.6.	Alkol çözeltilisinin uzaklaştırılması ve sineklerin kurutulması.....	52
Şekil 3.7.	Stereomikroskop altında diseksiyon işlemi .....	53
Şekil 3.8.	Uygulama grubu ve tarihi yazılan lam üzerine yerleştirilen kanat çiftleri .....	54
Şekil 3.9.	Lam üzerine yerleştirilen kanat çiftlerinin daimî preparat haline getirilme aşamaları .....	55
Şekil 3.10.	Sektörlerin kanat üzerinde gösterimi.....	55
Şekil 3.11.	Yabanıl tip kanat kılları.....	56

Şekil 3.12. Küçük tek tip mwh klon.....	57
Şekil 3.13. Büyük tek tip mwh klon.....	57
Şekil 3.14. Mwh ve flare hücrelerinin oluşturduğu ikiz klonlar.....	58
Şekil 3.15. mwh/mwh klonlar .....	58
Şekil 3.16 flr <sup>3</sup> klonlar .....	59
Şekil 4.1. Thiramın <i>A.cepa</i> hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri: a. metafazda yapışıklık, b. ring kromozom, c. anafazda yapışıklık, d. vagrant, e. anafaz köprüsü, f. mikronükleus (Skala=10 µm).....	65
Şekil 4.2. Methoxyfenozidin <i>A.cepa</i> hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri: a. metafazda yapışıklık, b. mikronükleus, c. anafazda vagrant, d. Anafaz köprüsü (Skala=10 µm) .....	68



## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>EZY</b>	Entegre Zararlı Yönetimi
<b>Flr<sup>3</sup></b>	Flare ırkı
<b>gr</b>	Gram
<b>KA</b>	Kromozom Anomali Oranı
<b>HCL</b>	Hidroklorik Asit
<b>L</b>	Litre
<b>Mİ</b>	Mitotik İndeks
<b>mL</b>	Mililitre
<b>MMS</b>	Metil Metan Sülfonat
<b>Mwh</b>	Multiple wing hair (çoklu kanat kılı) ırkı
<b>ppm</b>	Parts per million (milyonda bir birim)
<b>SMART</b>	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

# 1.BÖLÜM

## GİRİŞ

Dünya nüfusu her geçen yıl hızla artmaktadır. Bugün dünya nüfusu sekiz milyara ulaşmış olup yapılan tahminlere göre 2058 yılına gelindiğinde bu sayının 10 milyara ulaşması beklenmektedir [1]. Bu artışa bağlı olarak gıda ihtiyacı da günden güne artmaktadır. Artan nüfus ile kentleşme ve sanayileşme tarım alanlarına doğru ilerlemekte, bu alanlardaki tahribat ve daralma sebebiyle yeterli miktarda ve kalitede tarımsal ürün elde edilememektedir. Bu durum artan nüfusun temel besin ihtiyacının karşılanmasında birtakım sorunlara sebep olmaktadır. Bu sorunları aşmak ve tarımsal üretimi nüfus artış hızını karşılayacak konuma getirebilmek amacıyla dünyada ve ülkemizde pestisit adı verilen tarım kimyasalları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasalların kullanıldığı alanlarda tarımsal verimin önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Ancak pestisitlerin uygulandıkları alanlarda ve tarım ürünlerinin üzerinde uzun süre bozulmadan kalmaları çevreye ve etkileşimdeki canlılara zarar vermekte ve dolayısıyla besin zinciri aracılığıyla insan sağlığı üzerinde de bir takım olumsuz etkiler oluşturmaktadır [2] .

Pestisitler, zararlıları, yabancı otları ya da bitki hastalıklarını kontrol etmek için tasarlanan heterojen bir kimyasal birleşik grubudur. Pestisitlerin uygulanması, bitkilerin zararlılara karşı korunmasında kullanılan en yetkili yöntem olup; tarımsal üretkenliği ve ürün verimini arttırmada da önemli katkılar sağlamaktadır [3].

Eski zamanlardan beri doğal olarak oluşan bileşikler ya da doğal ekstratlar pestisit olarak kullanılmıştır. İlk kullanılan pestisitlerin tuz, kükürtlü kaya, tütün ve kırmızıbiber özütleri olduğu düşünülmektedir. 1940'lara kadar ise petrol yağları, ağır metaller, arsenik vb., yabancı otlarla mücadelede kullanılmıştır. Bu tarihten sonra ise en ünlüsü diklorodifenil trikloroetan (DDT) olan organik sentetik pestisitler bunların yerine kullanılmaya başlanmıştır. DDT'nin insektisit özelliklerinin Paul Müller tarafından keşfedilmesiyle sentetik pestisitlerin dönemi başlamıştır [4].

Pestisit, tarım ve bahçe ekosistemlerindeki zararlılarla mücadelede kullanılan çeşitli insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit ve evlerde kullanılan dezenfektanları tanımlamak için kullanılan yaygın bir terimdir [5]. Pestisitler, kimyasal, fiziksel ve benzer özelliklerinden dolayı birbirleri arasında farklılık göstermektedir [6]. Pestisitler ihtiyaca bağlı olarak çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Drum tarafından önerilen sınıflandırma yöntemi günümüzde hala kullanılmaya devam edilen en geçerli yöntem olarak bilinmektedir [7]. Bu yöneme göre pestisitler etki şekline göre, etkiledikleri canlı türüne göre ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır.

- 1) Etki şekline göre sınıflandırma: Bu yöntemde pestisitler, zararlı ile temas etme ve zararlı dokusuna girme yollarına göre sınıflandırılmaktadır. Sistemik ve sistemik olmayan pestisitler, mide zehirleri, fungistler ve repellentleri içermektedir.
- 2) Etkiledikleri canlı türüne göre sınıflandırma: Akarlara karşı kullanılanlar akarisit, yaprak bitlerine karşı kullanılanlar afisit, toprak bakterilerinin üremesini engelleyici olarak kullanılanlar bakteriyostat, dezenfektan gaz olarak kullanılanlar fumigant, mantarlara karşı kullanılanlar fungusit, yabani otlara karşı kullanılanlar herbisit, böceklere karşı kullanılanlar insektisit, böceklerin gelişimlerini olumsuz etkileyenler böcek gelişme düzenleyicileri, kenelere karşı kullanılanlar iksodisit, larvalara karşı kullanılanlar larvisit, yumuşakçalara karşı kullanılanlar moluskusit, maytlara karşı kullanılanlar mitisit, solucanlara karşı kullanılanlar nematisit, bitki gelişimlerini olumsuz etkileyenler bitki gelişme düzenleyicileri, kemiricilere karşı kullanılanlar rodentisit, kaçırıcı olarak kullanılanlar repellent, pestisitlerin etkilerini güçlendirmek amacı ile kullanılanlar sinerjist olarak isimlendirilmektedirler.
- 3) Kimyasal yapılarına göre sınıflandırma: Organik klor ve fosfor içeren pestisitler, karbamatlı pestisitler ve piretroid grubu pestisitlerdir.

Pestisitlerin kullanılmasıyla elde edilen birçok fayda olmasına rağmen bu bileşiklerin gelişigüzel ve yüksek dozda kullanımı hem çevreyi hem de insan sağlığını etkileyen sorunlara yol açmaktadır [8]. Özellikle tarımsal faaliyetlerde çok sık kullanılan pestisitler yapılarında bulunan sentetik maddelerden dolayı başlıca kirlilik kaynağı olarak kabul

edilmektedir. Ayrıca tarım alanlarında koruma önlemi olmaksızın kullanımları genetik bozukluklara yol açmaktadır [9, 10]. Buna ilaveten 10 yılı aşkın bir süredir birçoğu potansiyel karsinojen olarak kabul edilmektedir [11].

Pestisitlerin etki alanını sınırlamak neredeyse imkânsızdır. Çok küçük bir alana uygulanmış olsa bile etkileri; hava ile yayılarak, toprakla emilerek ya da suda çözünerek çok büyük bir alana ulaşmaktadır. Bir kez çevreye salınan pestisitler birçok farklı yol izleyerek yayılabilir. Miles ve Harris'e göre su içerisinde istenmeyen bazı sucul bitkilerle veya böceklerle mücadelede doğrudan suya yapılan pestisit uygulaması, pestisit bulaşan bitkilerden önce toprağa, toprak altı suları vasıtası ile tüm su ekosisteminde kirlenmeye neden olmaktadır. Ayrıca yanlış uygulama sonucu atmosferdeki partiküllerle karışan bu kimyasallar yağmur suları ile su ekosistemine karışarak da kirlenmeye sebep olmaktadır [12]. Pestisitler, toprak üstüne ve içine doğrudan, bitki ve tohum üzerine zirai ilaçlama şeklinde kullanılmaktadır. Bitki üzerine doğrudan yapılan uygulamalarda pestisitlerin büyük bir bölümü toprak üzerine düşmekte ve bu pestisitler toprak içerisinde bir takım dış etkenlere bağlı olarak (toprak yapısı, iklim vs.) hareket edebilmektedir [13]. Araştırmalar yanlış uygulama sonucu toprağa düşen organik klorlu pestisitlerin yarısından fazlasının 15 yıla yakın toprakta kalabileceğini göstermektedir. Organik klorlu pestisitlerin önemli rezüdü (kalıntı) kaynaklarından biri hayvansal besinler olarak bilinmektedir. Birçok araştırmada hayvansal besinlerde yüksek miktarda pestisit kalıntısı tespit edilmiştir [14]. Son dönemlerde pestisitlerin evlerin içinde ve çevresinde hamamböceği, karınca ve farelerle mücadelede kullanımı yaygınlaştığından dolayı pestisitlerin olumsuz etkilerine maruz kalma söz konusu olmaktadır.

1940'lardan beri pestisitlerin üretimi, pazarlanması ve sürekli kullanımı artarak devam etmektedir. Bu kimyasallar, geliştirilmeleri aşamasında veya kullanımları sırasında da insan sağlığını tehdit eden etkilere sebep olmaktadır. Bu etkiler her zaman belirgin yaralanmalar şeklinde görülmeyip yıllar içerisinde de ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca düşük doz pestisitlere sürekli maruz kalma orta ve uzun vadede kanserin birçok çeşidine, üreme bozukluklarına ve sinir sistemi bozukluklarına yol açmaktadır [15].

Pestisit etkilenmeleri küresel sağlık problemlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSO) raporlarına göre her yıl dünya genelinde 500.000 ile 1.000.000 insan pestisitlere maruz kalarak zehirlenmektedir. Toksik etkiye maruz kalanların yarısı ve ölenlerin %75'i tarım işçileridir. Geriye kalanlar ise pestisit kalıntısı bulunan yiyeceklere bağlı olan etkilenmektedir [16]. Gelişmekte olan ülkelerde pestisitlere bağlı zehirlenmeler, gelişmiş ülkelerde meydana gelen zehirlenmelerden daha fazladır. Üstelik gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha fazla miktarda üretim ve satış yapılmaktadır [17]. Bu durumun nedenleri sırasıyla; bu ülkelerde ciddi pestisit kontrol yasalarının olmaması ve pestisit kullanımının denetlenmemesidir [17, 18].

Pestisitler, etken maddelerinin DNA yapısını değiştirmesinden dolayı potansiyel mutajenler olarak kabul edilmektedir [19]. Pestisitlere ek olarak; ilaçlar, gıda maddeleri ve nanomateryaller gibi kimyasalların kullanımının her alanda hızla artması sonucunda bu kimyasal maddelerin insan genomunda olumsuz etkilerinin olup olmadığı son derece önem kazanmıştır. Böylece 1970'lerden günümüze kadar bu tür mutajenik ve genotoksik kimyasalların karsinojenik potansiyellerini tespit edebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir [20-22]. Son yıllarda, teknolojik gelişmelere paralel olarak çevresel mutajenlerin belirlenmesi için kullanılan kısa zamanlı test tekniklerinde ilerlemeler olmuştur [23].

Pestisitlerin tarım alanlarındaki bilinçsiz kullanımı ciddi tehlikelere sebep olmakta ve bu alanda daha çok çalışma yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Özellikle pestisit dozu aşımı şeklinde kullanımı ve yanlış zaman uygulaması çevre ve çevreyle ilişki halindeki canlılar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu çalışmada tarımsal alanlarda sıklıkla kullanılan Thiram ve Methoxyfenozidin olası genotoksik etkilerinin in vivo test yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda genotoksisite test yöntemlerinden Allium ve Smart Test metotları uygulanmıştır.

## 2. BÖLÜM GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mutasyonlar

DNA dizisinde meydana gelen değişiklikler mutasyon olarak tanımlanır. Mutasyonlar, organizmalar arasındaki çeşitliliğin temel nedenidir. Mutasyonlar, DNA replikasyonu sırasında meydana gelebileceği gibi DNA replike olmadan önce çeşitli kimyasallar ve fiziksel kuvvetler DNA segmentine zarar vererek mutasyona sebep olabilir. Bu hatalar bir sonraki replikasyona kadar düzeltilmez ise yeni oluşacak hücrelere aktarılabilir ya da DNA'nın replike olmasını bile önleyebilir. Başka bir şekilde ifade edecek olursak DNA replikasyon öncesinde mümkün olduğu kadar iyi durumda olmalıdır [24].

Soy hattı (germ) olmayan hücrelerde meydana gelen mutasyonlar somatik mutasyonlar olarak adlandırılır. Somatik mutasyonlar sadece vücut hücrelerinde gerçekleşir ve gelecek nesillere aktarılmaz. Gametlerde (sperm ve yumurta) ortaya çıkan mutasyonlar ise gelecek nesillere aktarılır. Bu mutasyonlar, genetik çeşitlilik ve evrimin temelini oluşturur. Mutasyonların olmaması organizmaların değişen ortam şartlarına uyum sağlamasını engeller ve nesillerinin tükenmesine yol açabilir [25]. Diğer taraftan mutasyonlar birçok insan hastalığı ve bozukluklarına neden olan zararlı etkilere sahiptirler. Özellikle kanser hastalıklarının ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli faktörlerden biri olarak mutasyonlar büyük dikkat çekmektedir [26, 27].

Mutasyonlar, kromozomlarda sayısal ve yapısal değişimlere sebep olan kromozomal mutasyonlar; kromozom seviyesinde belirlenemeyen ancak fenotipteki değişimlerle tespit edilen gen mutasyonları olarak sınıflandırılmaktadır [28].

### **2.1.1. Kromozomal Mutasyonlar**

Kromozomal mutasyonlar, kromozom sayısında veya kromozom yapısında meydana gelen farklılıklar olarak tanımlanmaktadır. Hücredeki genetik bilgide görülen bu tarz değişimler, vücut sistemlerinin büyüme ve gelişmesine etki ederek bu sistemlerin işleyişini bozmaktadır [29]. Kromozomal mutasyonlar yumurta veya sperm üretimi sırasında ya da doğumdan sonra bilinmeyen sebeplerden dolayı ortaya çıkabilir [30].

İki ana kromozomal mutasyon tipi vardır: kromozom sayısındaki değişiklikler ve kromozom yapısındaki değişiklikler [31].

#### **2.1.1.1. Sayısal kromozomal mutasyonlar**

Kromozom sayıları, diploid bir genoma haploid sayıda kromozom ya da kromozomların eklenmesi veya kaybıyla değişkenlik göstermektedir. Kromozom sayısındaki bu değişimler kromozomların ayrılmaması (nondisjunction) sonucu meydana gelir. Ayrılmama (nondisjunction) mayoz sırasında bir çift kromozomun ayrılamaması ve zıt kutuplara hareket edememesi olarak tanımlanmaktadır. Bu durum anormal miktarda genetik madde içeren yeni bir hücre oluşumuna yol açmaktadır [32].

Sayısal anomaliler; anoploidi ve poliploidi olarak iki başlık altında değerlendirilmektedir. Anoploidi, ekstra veya eksik bir kromozom nedeniyle anormal bir kromozom sayısına sahip olma durumudur. Anoploidi en sık görülen mutasyon türüdür. Diploid genoma bir kromozom eklendiğinde ( $2n+1$ =trizomi) ya da tek bir kromozom eksildiğinde ( $2n-1$ =monozomi) anoploidi meydana gelir [33]. Poliploidi ise kromozom takımlarının mayoz veya mitoz bölünmede ayrılmalarında sorun oluştuğunda meydana gelen mutasyonlardır. Poliploidi otopoliploidi ve allopoliploidi olmak üzere 2 gruba ayrılır [26].

Otopoliploidi bütün kromozom takımları tek bir türden kaynaklanmaktadır. Allopoliploidi ise iki veya daha fazla türün hibridizasyonu sonucunda meydana gelmektedir [26].

### **2.1.1.2. Yapısal kromozom mutasyonları**

Spontan ya da dış etkenler sonucu kromozomlarda oluşan kırıklar yapısal mutasyonlara sebep olmaktadır. Kromozomlardaki kırılmalar kromozom sayısını etkilememektedir. Ancak bu kırılmalar, kromozomlarda eksilme, artma ve yer değiştirme gibi yapısal değişimleri tetiklemektedir. UV ışınları, ısı, kimyasallar, radyasyon gibi etkenlerin hücredeki kromozom kırılmalarını spontan oluşanlara kıyasla daha çok arttırdığı bilinmektedir [34].

Yapısal anomaliler nesilden nesile aktarılabileceği gibi sonradan da oluşmaktadır. Sonradan oluşumlar, radyasyon, kimyasallar, virüs enfeksiyonu gibi indükleyicilerle ya da spontan olmaktadır [35].

#### **Delesyon**

Delesyon, kromozomdaki bir parçanın kaybolması olarak bilinir. Delesyonun sebepleri arasında homolog kromozomlar ya da kardeş kromatitler arasında eşit olmayan parça değişimleri (krossing-over), dengeli translokasyon veya inversiyon taşıyıcılarının gametlerindeki dengesiz kromozom bölünmesi ya da kromozomdaki bir parçanın dış etkenler sebebiyle koparak kaybolması gösterilir. Kopan kromozom parçasında sentromer olmadığı için iğ ipliklerine tutunamaz ve bu nedenle bölünmeye katılamaz ve çekirdek dışında yok olur. Sonuç olarak, delesyonlar gen kaybına neden olur [36].

#### **Duplikasyonlar**

Duplikasyon, kromozomun bir parçasının veya lokusun tekrar etmesi olarak tanımlanmaktadır. Mayoz öncesi replikasyon hataları, mayoz sırasında ise sinaps yapmış kromozomlar arasındaki dengesiz krossing over'dan kaynaklanmaktadır. Duplikasyon, bir genin çok sayıda kopyasının olmasına olanak sağlaması, fenotipik çeşitliliğe arttırması gibi önemli özellikleri bulunmaktadır [34].



## **İnversiyon (Ters Dönme)**

Kromozomdan kopan bir parçanın, çekirdek dışında kaybolmadan 180° dönerek koptuğu yere yapışması olarak bilinmektedir. Perisentrik ve parasentrik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Parasentrik inversiyonlarda kırılma kromozomun uzun ya da kısa kolunda gerçekleşir ve kopan parça sentromerin dışında ters dönmektedir. Bu tip ters dönmelerde kromozom morfolojisi değişmez ancak gen sırasında değişim görülmektedir. Perisentrik ters dönmelerde, kromozomun hem kısa hem de uzun kollarında meydana gelen kırılmalarla aradaki parça sentromerde dahil eksen etrafında 180 derece ters dönerek yapışmaktadır. Parasentrik ters dönmelerin aksine kromozom gen sırası ile yapısının da değiştiği görülmektedir [37].

## **Translokasyonlar**

Aynı karyotip içerisinde bulunan kromozomlardan kopan parçaların bu kromozomlar arasında değiştirilmesi translokasyon olarak tanımlanmaktadır. Resiprokal, Robertsonian ve insersiyonal olmak üzere üç ana grupta incelenirler [33].

### **Resiprokal Translokasyonlar**

Birbirinin homoloğu olmayan iki kromozomdan kopan parçaların yer değiştirmesi durumudur. Kromozom sayısına etki etmeyen bu tip translokasyonlar genellikle dengelidir. Bu translokasyonlar klasik bantlama yöntemi ile kolayca tespit edilmektedir [38].

### **Robertsonian Translokasyonlar**

Kısa kollarını kaybeden akrosentrik kromozom çiftinin, uzun kollarının sentromer ya da sentromerlerine yakın noktalardan birleşmeleri sonucu oluşan yaygın bir kromozom mutasyonu olarak bilinmektedir. Kısa kol kaybının fenotip üzerinde bir etkisi yoktur [39, 40].

## İnversiyonal Translokasyonlar

Çift kırık ile kopan intersisyel bir kromozom parçasının başka bir kromozomun kırık bölgesiyle veya koştığı kromozomdaki üçüncü kırık bölgeyle yapışması sonucu oluşmaktadır [41].

### 2.1.2. Gen Mutasyonları

Bir genin mutasyonu, DNA ve RNA dizilimindeki bir genomun kısa bir bölgesindeki nükleotit sekansında oluşan bir değişiklik sebebiyle oluşur. RNA da meydana gelen değişiklik her RNA için birkaç RNA kopyası sentezlendiğinden dolayı ciddi değildir. Ancak DNA dizisindeki değişiklik kodlanmış proteinin tüm kopyalarını etkiler ve bu proteinde yapısal ve işlevsel değişikliklere veya ekspresyonun tamamen kaybına neden olur [42].

Gen mutasyonları, spontan ya da UV, radyasyon ve bazı kimyasal kanserojenler olan çevresel faktörlere maruz kaldığında ortaya çıkmaktadır [43]. Genel olarak dört tip gen mutasyonu vardır: Kalıtsal, kazanılmış, uyarılmış ve spontan mutasyonlar. Kalıtsal mutasyonlar ya da soy hattı mutasyonları gametlerde oluşur ve gelecek nesillere aktarılır. Kazanılmış (somatik) mutasyonlar UV gibi çevresel faktörlere maruz kalınması sebebiyle meydana gelmektedir. Soy hattı hücreleri dışında herhangi bir hücrede görülebilen bu mutasyonlar, gelecek nesillere aktarılamaz [44, 45]. Spontan mutasyonlar depürinasyon (bir nükleotidden pürin bazının yitirilmesi) veya deaminasyon (bir amin grubunun bir bazdan çıkarılması) nedeniyle oluşmaktadır [46].

DNA dizilerinin mutasyona yol açan değişimleri çok çeşitlidir. En basit mutasyon bir baz çiftinin diğerinin yerine geçmesi olarak tanımlanan nokta mutasyonlarıdır. Bir geçiş bir pürin ile bir diğer pürinin yer değişmesi ( $A \leftrightarrow G$ ) ya da bir primidin ile öteki primidin yer değiştirmesidir ( $C \leftrightarrow T$ ). Çapraz değişimlerin (transversiyon) sekiz farklı çeşidinde, pürinlerin primidinlerle ya da tersi yer değiştirmelerdir ( $A$  ya da  $G \leftrightarrow C$  ya da  $T$ ) [47].

DNA zincirine eklenen ya da çıkan bazların tripletin kaymasına sebep olduğu mutasyonlar çerçeve kayması olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla geri mutasyon durumunun olanaksız olması nedeniyle öldürücü mutasyon olarak bilinmektedir [48]. Genetik şifrede meydana gelen büyük değişiklikler sebebiyle genin fonksiyonunda değişiklikler oluşarak o gene ait enzimin işlevini yitirmesine sebep olmaktadır. Sonuç olarak sentezlenen proteinler farklılaşır ve bu durumda fenotip değişikliği olarak gözlemlenir.

DNA'da oluşan değişimlerin tamamı mutasyon olarak kabul edilmesine rağmen fenotipte gözlemlenemeyen mutasyonlar bulunmaktadır. Bu mutasyonlar, DNA baz dizisinde tek bir yer değiştirme sonucu, hala aynı amino asidi kodlayan yeni bir kodon oluşumuna sebep olabilir. Üründe herhangi bir değişiklik olmadığından, bu tür mutasyonlara sessiz mutasyonlar adı verilir [49]. Örneğin, UAC tripletinin UAU'ya dönüşmesi gerçek anlamda bir nokta mutasyonu olmasına rağmen her iki triplette de aynı aminoasidi ( tirozin) kodladığından genin protein ürününde bir değişim görülmez. Sessiz mutasyon oluşumu genetik şifrenin dejenere özelliğinden, yani tripletlerin ilk iki bazı son derece spesifik iken üçüncü bazlardaki farklılığın tolere edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, fonksiyonu etkilemeyen bölgeler olarak bilinen intronlarda meydana gelen temel dizi değişiklikleri de sessiz mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır. Sessiz mutasyonların tespit edilebilmesi için ilgili genin baz dizisinin belirlenmesi gerekmektedir [48]. DNA baz dizilimindeki nükleotit değişiklikleri tripletin de anlamını değiştirerek farklı aminoasit sentezlenmesine sebep olmaktadır. Yanlış anlamlı (missens) olarak adlandırılan bu mutasyona Orak Hücre Anemisi örnek olarak gösterilmektedir. Beta glutamatı kodlayan CTC tripletinde CAC şeklinde meydana gelen değişim Valin amino asidini kodlayarak Orak Hücre Anemisine sebep olmaktadır Protein kodlayan bir bölgede meydana gelen nükleotid bazlarının değişimi, bir amino asit kodununun sonlandırma kodonuna dönüşmesine sebebiyet verebilir. Bu tür mutasyonlar, polipeptit zincirinin beklenenden önce sonlanması sonucunu doğurarak anlamsız (nonsense) mutasyonlar olarak adlandırılmaktadır. Anlamsız mutasyonun etkileri proteinin kısalma düzeyine ve işlevsel gerekliliklerin karşılanması için ne ölçüde proteinin gerekli olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [50].

### 2.1.3. Mutajenler

DNA'nın yapısını değiştiren ve bu nedenle mutasyonların sıklığını arttıran kimyasal veya fiziksel bileşikler mutajen olarak adlandırılır. Birçok mutasyon kansere sebep olduğu için mutajenler aynı zamanda kanserojendir. Mutajenlerin doğası değişken olup; bunlar genellikle iyonize radyasyonlar ya da kimyasal bileşiklerdir. Mutajenler, replikasyon sırasında DNA zincirine girebilir ve bu sayede DNA ile reaksiyona girerek yapısal değişimlere sebep olabilir, dolaylı olarak hücrelerin doğrudan mutajenik etkiye sahip kimyasalları sentezlemelerine neden olarak mutasyon oluşturabilir ve son olarak baz analogları gibi davranarak replikasyon sırasında hatalara neden olurlar [51].

#### 2.1.3.1. Kimyasal mutajenler

Kimyasal mutajenler, DNA ile etkileşime girdikleri mekanizmaya bağlı olarak 4 genel gruba ayrılırlar.

- 1) Yapısal olarak bazlara benzeyen baz analogları
- 2) İnterkalasyona sebep olan mutajenler
- 3) Alkilleyici ajanlar
- 4) Reaktif oksijen gibi DNA ile reaksiyona girebilen kimyasallar [52]

**Baz analogları:** Pürin ve pirimidin bazları ile benzer yapıda olan kimyasal mutajenlerdir. DNA polimeraz bu kimyasalları bazlardan ayırt edemediği için replikasyon sırasında yeni sentezlenmiş DNA molekülleri oluşturabilirler. 5-bromourasil en iyi bilinen baz analogudur ve timinle benzer özelliktedirler. Ancak bu mutajen DNA yapısına katıldığında adenin yerine guanin ile eşleşerek mutasyona yol açmaktadır [26,53, 54, 55, 56, 57, 58].

**İnterkalasyon ajanları:** Bu kimyasallar, DNA bazları arasına girerek DNA'nın üç boyutlu yapısını bozabilir ve replikasyon sırasında DNA polimerazın hata yapmasına neden olur. Replikasyon sırasında oluşan bu hata çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift mutations) yol açar ve fazladan nükleotid eklenmesi veya çıkmasıyla

sonuçlanır. Bu tip kimyasal mutajenlere örnek olarak etidyum bromid, akridin oranj ve proflavin örnek verilebilir [50].

**Alkilleyici ajanlar:** Bu mutajenler DNA'ya kovalent olarak bağlanıp replikasyonunu engelleyerek hücre ölümlerine sebep olmaktadır [59]. Alkilleyici ajanlar normal hücrelerde, özellikle sindirim sisteminde, kemik iliğinde, testislerde ve yumurtalıklarda sürekli bölünen hücreler için toksik etki gösterebilirler. Ayrıca alkilleyici ajanların çoğu kanserojen özelliklere sahiptir [60].

**Tautomerik değişimler:** DNA'daki bazların her biri atomların pozisyonlarında ve atomlar arasındaki bağlarda izomer olan tautomer adı verilen çeşitli formlardan biri olarak görülebilir. Her bir bazın keto ve amino formları normal olarak DNA'da bulunurken bazların imino ve enol formları nadir olarak görülür. Keto grubundaki timin ve guaninin enol formuna dönüşümü, adenin ve sitozinin bulunduğu amino grubunun imino formuna dönüşümü tautomerizasyona örnektir. Sonuç olarak amino formundaki A, keto formunda olan T ile eşleşirken imino formunda A, enol formunda C ve T ile eşleşir [61].

### 2.1.3.2. Fiziksel mutajenler

**UV ışınları:** Nükleik asitlerin, özellikle pirimidin ve pürinlerin, yaklaşık 260 nm dalga boyunda UV radyasyonunu yoğun şekilde emebilme yeteneği, nükleik asitlerin analiz ve tanısında kullanılan önemli niteliklerden biri olarak kabul görmektedir. UV radyasyonun olumsuz etkileri primidinlerde oluşan, timin-sitozin ve sitozin-sitozin dimerleri olarak görülmektedir. Primidin çiftleri arasında görülen dimerler DNA'nın üç boyutlu yapısını bozarak replikasyon mekanizmalarını bloke etmektedir. Replikasyonun durmasına sebep olan bu durum UV ışınlarının mikroorganizmalar üzerindeki ölümlerle sonuçlanan etkisinin kaynağı olarak bilinmektedir [34].

**İyonize radyasyon:** Radyasyon doğrudan bir DNA molekülünü iyonize ederek zarar verebilir ancak; dokular yaklaşık %80 su içerdiğinden iyonlaşmaların çoğu su moleküllerinde meydana gelir. Bu durum yüksek oranda reaktif H ve OH serbest

radikallerinin hızlı bir şekilde üretilmesine yol açar. Bunlar DNA’da büyük hasara neden olabilir [62].

**Sıcaklık:** Şeker grupları ve bazlar arasındaki  $\beta$ -N-glikozidik bağları sıcaklık sebebiyle ayrılmaktadır. Bu şekilde bazdan ayrılan şeker ve fosfat grupları yıkıma uğrayarak DNA sarmalında tek nükleotidin eklenebileceği bir boşluk oluşturmaktadır. Eğer DNA onarım mekanizması bu boşluğu onarmaz ise bu alanda mutasyon gerçekleşme ihtimali artmaktadır [53-57].

## **2.2. Pestisitler**

### **2.2.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması**

Pestisitler, etki şekline göre, etkiledikleri canlı türüne ve kimyasal yapılarına göre 3 ana sınıfta toplanmaktadır [7].

#### **2.2.1.1. Etki şekline göre sınıflandırma:**

Pestisitlerin zararlıya temas etme veya yapısına girme yolları o pestisitlerin etki mekanizmasını göstermektedir. Bunlar, sistemik pestisitler, sistemik olmayan pestisitler, mide zehirleri fumigants ve repellentleri içermektedir [6].

1) Sistemik Pestisitler: Bu tür pestisitler, bitki veya hayvanlar tarafından emilerek işlenmemiş dokulara iletilen pestisitler olarak tanımlanmaktadır. Sistemik herbisitler bitki içerisinde ilerleyerek yaprak, gövde ve kökteki işlenmemiş dokulara ulaşmaktadır. Bu herbisitler, püskürtme uygulamaları ile zararlı otları öldürme yeteneklerine sahiptir. Bitki vasküler sistemi içinde kolayca hareket ederek dokulara etkili bir şekilde nüfuz etmektedir. Pestisitlerin bitki dokularındaki hareketi tek yönlü veya çok yönlü olabilir. Bazı pestisitler, bitki içerisinde hem yukarı hem de aşağı doğru hareket edebilirken diğer pestisitler sadece yukarı doğru hareket edebilir. Örneğin; pestisit kök bölgesine uygulanırsa bitki boyunca ilerler fakat yapraklara uygulandığında bitki boyunca hareket etmeyecektir. Ayrıca birkaç pestisit lokal olarak sistemik olup bir temas noktasından

sadece kısa bir mesafeye hareket eder. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ve glyphosate sistemik pestisitlere örnek olarak gösterilebilir [63].

2) Sistemik olmayan (temaslı) pestisitler: Sistemik olmayan pestisitlere, hedef zararlı ile temasa geçtiğinde etki edebildiği için temaslı pestisitlerde denir. Bu pestisitlerin etkilerini gösterebilmeleri için zararlı ile fiziksel temasa geçmeleri gereklidir. Pestisitler, zararlıların sistemine epidermleri ile temas ettiklerinde girer ve zararlıyı zehirleyerek ölümüne sebep olur. Temaslı pestisitlere örnek olarak paraquet ve diquad dibromid gösterilebilir [6].

a) Mide zehirleri: Zararlıların vücuduna ağız yoluyla giren bu pestisitler, sindirim sistemine kadar ilerleyerek midede zehirlenmelere sebep olmaktadır. Mide zehirleri, zararlıların beslenmesi sırasında yapraklarda ve bitkinin diğer kısımlarında uygulanan böcek ilaçlarına maruz kaldıklarında elde edilir [6].

b) Fumigantlar: Fumigantlar, buhar üreterek hedef zararlılara etki eden pestisitlerdir. Buhar formundaki bu pestisitler zararlıların trakeol sistemlerini kullanarak yapılarına girer ve zehirleyerek zararlıların ölümüne sebep olur. Aktif bileşenlerinden bazıları yüksek basınç altında paketlenirken sıvılardır ancak serbest kaldıklarında gaz formuna dönüşürler. Bu pestisitler zararlıları meyvelerden, sebzelerden ve tahıllardan çıkarmak için kullanılır. Fumigantlar topraktaki zararlıların kontrol edilmesinde de çok faydalıdır [6].

c) Repellentler: Repellentler öldürmezler ancak zararlıları temizlenmiş alanlardan ve depolardan uzak tutarlar [6].

#### **2.2.1.2. Etkiledikleri canlı türüne göre sınıflandırma**

Bu yöntemde pestisitler hedefi olan zararlı organizmalara göre sınıflandırılır ve pestisitlere etkinliklerini yansıtan özel isimler verilir.

İnsektisitler: Böceklerin kontrolü amacı ile kullanılan tarım ilaçları olarak tanımlanmaktadır. Bugün kullanılan insektisitlerin tamamına yakını hedef canlının sinir sistemine etki etmektedir. Böceklerin merkezi sinir sistemi (MSS), memeli MSS kadar gelişmiş bir sistemdir. Çevre sinir sistemi ise memelilerdeki ile benzer özellikler göstermektedir. Bu benzer özellikler sebebiyle başta insanlar olmak üzere tüm memeliler insektisitlerin yan etkilerine maruz kalmaktadır Kimyasal insektisitler, diğer pestisitlere oranla hedef olmayan canlılar üzerinde daha çok akut zehirlenmelere sebep olmaktadır. [64].

Herbisitler: Tarım arazilerinde çıkararak ürünlerde zarara sebep olan yabancı otlarla mücadelede yaygın olarak kullanılan tarım ilaçlarıdır. Doz aşımı olmadığı halde yabancı otlar haricinde faydalı bitkilere de etki eden seçici olmayan herbisitlerde bulunmaktadır. Bu herbisitler, Memeliler ve böcekler üzerinde az da olsa etki göstermektedir. Herbisitlerin uygulandıkları arazilerde, bitkilerin büyüme mevsiminin başından sonuna kadar 3 ila 6 ay boyunca kalıcı etkili olmaları beklenmektedir [65].

Fungusitler: Mikromantarlar, bitkilerde global ölçekte tarımsal ürün kayıplarına ve çok sayıda hastalığa neden olan zararlılardan biri olarak bilinmektedir. Bu zararlıların gelişmesini durduran maddelere fungusit adı verilmektedir. 1960 ve 1970'li yıllara kadar mantarlarla enfekte olmuş bitkilerin tedavisi kısıtlı olup, bu zamana kadar keşfedilen fungusitler koruyucu amaçla uygulanan maddelerdir. Bunlar bitki yüzeyinde kalıp dokulara nüfuz etme yeteneği ve sistemik mantar enfeksiyonlarını önleyici etkileri olmayan maddelerdir. 1970'li yıllardan itibaren sistemik fungusitler geliştirilmiş ve mantarla enfekte bitkilerin tedavilerinde başarılı olunmuştur [66].

Fungusitler diğer pestisitlerle karşılaştırıldığında en yaygın kullanılan maddeler olarak kabul edilmektedirler. Beton, tekstil, ilaç ve kozmetik gibi büyük sektörlerin yanı sıra matbaa, oymacılık gibi alanlarda koruyucu olarak kullanılmaktadır [65].

Moluskusitler: Yumuşakça olarak adlandırılan sümüklüböcekler insanlarda Schistosomiazis, hayvanlarda kelebek hastalığının arakonakçılarıdır. *Bulinus* ve *Biomphalaria* türleri yaşamını tümüyle suda geçirmekte; *Oncomelania* türleri ise hem su



hem de karada yaşam sürmektedirler. Belirtilen türlerle mücadele amacı ile bakır sülfat, metaldehid, niklozamid ve metiyokarb gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) *Schistosomiasis* mücadelesinde sadece niklozamidi önermektedir [67]. Tarımsal üretimde sebze, turunçgiller, meyve, buğday, arpa, tütün, patates, çilek ve süs bitkileri ile ormancılıkta ağaç ve fidan zararlılarına karşı kullanılırlar. İlaçların uygulama zamanı ilkbahardır. Ancak yumuşakçaların ortaya çıktıkları diğer zamanlarda da ilaçlama yapılır. Islatılmış hazır yemler salyangoz ve sümüklü böceklerin gezdiği alanlarda 2 m ara ile uygulanmaktadır. Uygulama alanının ayrıca sulanması belirtilen türlerin bu bölgeye çekilmesinde etkili olmaktadır [68].

### Fumigantlar

Böcek, kemirici ve solucan zararlılarına karşı kullanılan, uygulandıkları alanlarda gaz oluşumu ile ulaşılamaz alanlara da ulaşabilen pestisitler olarak tanımlanmaktadır. Normal uygulamalarla sonuç alınmadığında hububat depoları ve gemi gibi kapalı alanlarda uygulanmaktadır [69]. Fumigant olan metilbromid uygulandığı alanlarda böcek, solucan ve yabancı ot gibi zararlı canlıları tamamen yok etmektedir. Hayvanlarda zehirlenme sonucu solunum güçlüğü, kalp bloğu ve MSS belirtileri bildirilmiştir [70].

Diğer fumigantlara örnek olarak; karbontetraklorür, etilen diklorür, etilen dibromür, etilen oksit, alüminyum fosfür, magnezyum fosfür, dazomet, dikloroetan, dikloroproan gösterilmektedir. Bu gruptan halojenli alkanlar karaciğer vd. dokularda stokrom p450 enzim sitemini baskılamalarından dolayı dikkat çekmektedir. Karbontetraklorür ve etilen bromür karaciğer nekrozu, kanser ve mutasyon gibi istenmeyen etkilere neden olmaktadır. Fumigant amaçla kullanılan çoğu madde vücutta oksidatif hasar meydana getirmektedir [71].

### Nematisitler

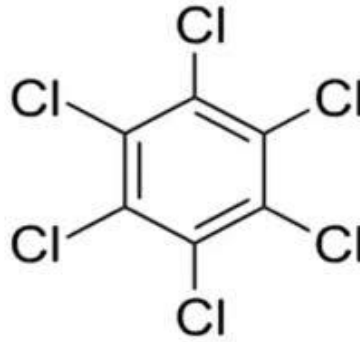
Nematot olarak adlandırılan solucanlar beslenme alışkanlıkları dolayısı ile nematisitleri ağız yolu ile almaları da zordur. Bu nedenle genellikle geniş etki spektrumlu yüksek derecede uçucu etkinliğe sahip ve toprağa nüfuz edebilen yukarıda bahsedilen fumigant maddeler bu amaçla kullanılmaktadır [72]. Fumigant nematisitler solucan vücut duvarından içeri alındıktan sonra vücut boşluğuna geçmektedir. Vücut sıvısı ile farklı iç

organlara ulaşır. Eş zamanlı olarak parazitte enzim etkinliği ile sinir ve solunum görevlerini aksatarak ölüme neden olurlar [65].

### 2.2.1.3. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırma

Pestisitlerin kimyasal bileşimlerine ve aktif bileşenlerinin doğasına göre sınıflandırması sıklıkla kullanılan faydalı bir sınıflandırma yöntemidir. Bu yöntem ile ilgili pestisitlerin etkinliği, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilgili bilgiler elde edilmektedir. Bu bilgiler; pestisitlerin hangi konsantrasyonlarda ve ne şekilde uygulanacağı, sağlıklı bir uygulama için alınacak önlemlerin tespitini kolaylaştırması açısından önemlidir. Kimyasal bileşim temelinde pestisitler 5 temel grup altında tanımlanmaktadır.

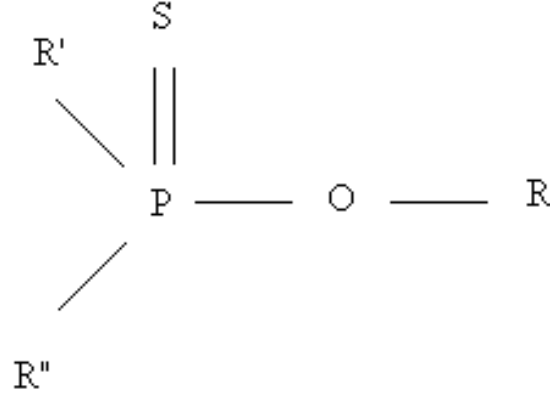
1) Organik Klorlu Pestisitler: Bu pestisitler (klorlu hidrokarbonlar olarakta bilinirler), beş ya da beşten fazla klor atomunun bağlanması ile oluşan organik bileşiklerdir (Şekil 2.1). Bu pestisitler, tarımsal üretimde ve insan sağlığında kullanılan ilk pestisit grubunu temsil etmektedir. Birçoğu yaygın olarak böceklerin kontrolü için böcek ilacı olarak kullanılmaktadır. Organik klorlu pestisitler çevrede uzun süreli kalıntıya neden olmaktadır. Böcekler üzerinde sinir sistemini bozarak etkili olan bu pestisitler, sarsıntılara felce ve hatta ölüme sebep olmaktadır En iyi bilinen örnekleri DDT, aldirin, deldirin, endosulfan ve chlordan'dır [6].



Şekil 2.1. Organik klorlu pestisitlerin kimyasal yapısı

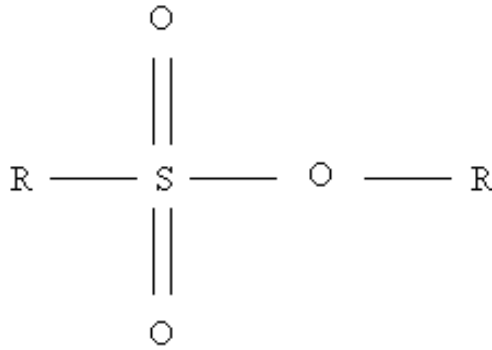
2) Organik Fosforlu Pestisitler: Fosforik asitten türetilen esterler olarak bilinmektedir (Şekil 2.2). İnsanda, asetilkolinesterazın inhibe edilmesi ile merkezi sinir sistemi üzerinde hareket ederek, enzimin aktif bölgesindeki hidroksil grubunun serin fosforilasyonu ile

sinir uyarımını bozar [73, 74]. Refleks kaybı, baş ağrısı, mide bulantısı gibi semptomlara, koma ve ölümlerle sonuçlanan etkilere sebep olmaktadır [4, 75].



Şekil 2.2. Organik fosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı

3) Organik Kükürtlü pestisitler: Merkez atomu kükürt olan bu pestisitlerin böceklerdeki zehir etkileri çok düşüktür (Şekil 2.3). Flavon monooksijenazların (FMO) ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki rolünü araştıran şimdiye kadar yapılmış çalışmalar, sülfür içeren pestisitlere karşı aktivitelerinin anlamlı olduğunu bildirmektedir [76].



Şekil 2.3. Organik kükürtlü pestisitlerin kimyasal yapısı

4) Karbamatlı Pestisitler: Asitlerden veya dimetil N-metil karbamik asitten türetilmiş esterlerdir (Şekil 2.4). Herbisit, insektisit, fungusit ve nematisit olarak kullanılmaktadır. Sudaki çözünürlükleri oldukça fazla olan bu tür insektisitler, organofosforlu pestisitler gibi ChE enzimine etki ederler ve topraktaki kalış süreleri bir haftadır [77].



### 2.2.2. Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri

Pestisitlerin tarım ve sağlık sektöründe kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen aşırı ve dikkatsiz kullanımları sebebiyle insan ve çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Pestisitler, yüksek biyolojik aktiviteleri ve toksisiteleri sebebiyle çevresel kirleticiler arasında benzersiz bir yere sahiptir. Pestisitlerin çoğu etki edeceği organizma ile başka organizmalar arasında ayırım yapmaksızın etki göstermektedir. Yanlış kullanılma durumunda insanlar, hayvanlar ve diğer canlılara ve çevreye zarar verebilirler. Pestisitlerin sebep olduğu ölümlerin yılda 5000 ila 20.000 kişi arasında olduğu 500.000 ila bir milyon kişinin de pestisitlere bağlı olarak zehirlendiği tahmin edilmektedir [81, 82]. Toksik etkiye maruz kalanların yarısı ve ölenlerin %75'i tarım işçileridir. Geriye kalanlar ise pestisit kalıntısı bulunan yiyeceklere bağlı olan zehirlenmelerdir [6].

Pestisitler, insan vücuduna; pestisit bulaşmış su ya da gıda maddelerinin tüketilmesi ile oral yoldan; pestisit partikülleri bulunan ortamlarda solunum yoluyla ve pestisit ile direk temas ederek deri yoluyla girmektedir [83].

Akut etkiye maruz kalma, dermal (cilt), inhalasyon (akciğer), oral (ağız) ve gözlerin etkilenmesi ile oluşur. Akut toksisite, test hayvanlarının dermal toksisitesi, inhalasyon toksisitesi ve oral toksisitesi incelenerek belirlenmektedir. Akut etki genellikle temastan veya pestisite maruz kaldıktan kısa bir süre sonra ortaya çıkmaktadır. Tarım alanlarındaki pestisitlerin çevreye yayılımı ya da uygulaması sırasında oluşın zehirlenmeler insanda akut hastalığa sebep olmaktadır [84, 85]. Baş ağrısı, vücut ağrıları, deri döküntüleri, bulantı, baş dönmesi, görme bozukluğu, kramplar ve panik atak gibi semptomların yanı sıra ağır vakalarda koma ve ölümlle sonuçlanan durumlar görölmektedir. Dünya genelinde her yıl 3 milyon kişi pestisit kaynaklı akut zehirlenmeye maruz kalmaktadır [86].

Kronik etki ise belirli bir süre içerisinde tekrarlanan ve küçük dozlardan kaynaklanan zararlı etkiler olarak tanımlanmaktadır. Bir pestisitın kronik toksisitesini laboratuvar analizleriyle tespit etmek akut etkiye oranla daha zordur. Pestisitlere uzun süreli ve tekrarlı maruz kalma inanlarda kronik hastalıklara sebep olmaktadır. Belirtileri hemen

fark edilmeyen bu hastalıklar zaman içerisinde ortaya çıkmaktadır. Çiftçiler ve tarım işçileri daha yüksek risk altındadır. Bununla birlikte özellikle kirlenmiş yiyecek ve su tüketimi ya da tarım alanlarından çevreye yayılan pestisitler nedeniyle genel nüfusunda eşit oranda etkilenme durumu vardır [87]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, pestisitlere maruz kalma ile vücut sistemlerine etki eden insan kronik hastalıklarının insidansı arasında korelasyon kurmaktadır [88].

### **2.2.3. Pestisitlerin çevre üzerindeki etkileri**

Pestisitler, zararlılar ve sebep oldukları hastalıklarla mücadelede modern tarımda önemli rol oynamaktadır. Ancak yanlış uygulamalar ya da yok edilmeyen atıkları çevre üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Pestisitlerin çevre üzerinde uzun vadeli etkileri biyoçeşitliliğin azalmasına ve ekosistemdeki işleyişin bozulmasına yol açmaktadır.

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı evaporasyon ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgârlarla taşınarak yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönmektedir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, kalıntı ve toksisiteye neden olabilmektedir [89].

Pestisitler, toprak ve suyu çeşitli şekillerde kirletmektedir. Pestisitler genellikle su içinde çözünmezler ancak kullandıkları formülasyonlar süspansiyon oluşturarak bu pestisitlerin toprak, yeraltı suyu ve akarsularda daha iyi yayılmasını sağlamaktadır. Bazı pestisitler organik madde ve kil partikülleriyle etkileşime girerken, diğerleri toprağın doymun olmayan bölgelerinde organik buhar olarak hareket edebilirler [90]. Pestisitler ağır yağmur sırasında drenaj yoluyla da yüzey su kaynaklarını kirletmektedir. Pestisitlerin yüzey suyu yoluyla taşınarak ve sualtı çevrelerinde birikmeye neden olarak sualtı hayatı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır [91].

#### 2.2.4. Dünyada ve Türkiye’de pestisit kullanımı

Son bir yılda dünya genelinde iki buçuk milyon tonun üstünde pestisit kullanıldığı görülmektedir. Bu kullanımda herbisitler %47’lik oranla ilk sırada bulunmaktadır. Herbisitleri, insektisitler %29 ile fungusitler ise %19’luk kullanımla takip etmektedir. Toplam kullanımın %80 e yakını herbisit ve insektisitlerden oluşmaktadır. Geriye kalan kullanımın %15’i fungusitler, %5’i diğer pestisitleri içermektedir [92].

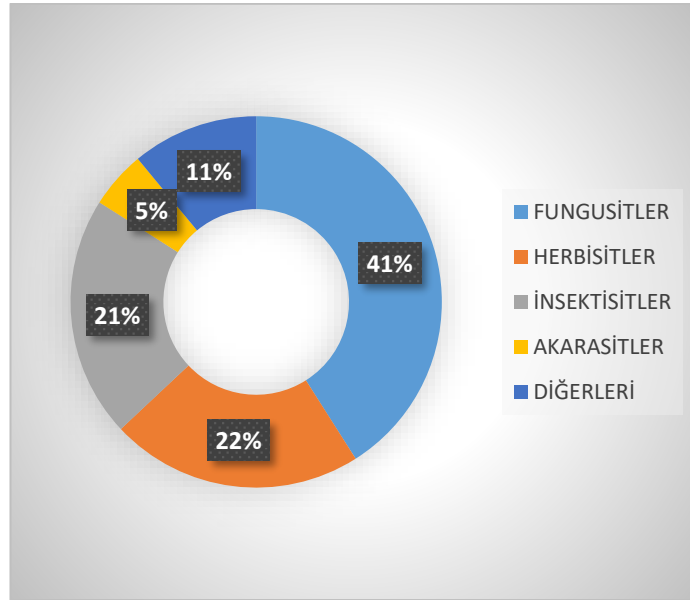
Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre dünya genelinde ekili alan başına ortalama pestisit kullanımı 2,7 kg/ha olarak belirtilmektedir. Dünyada ekili alan başına ortalama kullanımın en fazla olduğu ülkeler arasında Asya ülkeleri dikkat çekmektedir. Japonya 14,09 kg/ha, Kore Cumhuriyeti 12,78 kg/ha, Çin 11,31 kg/ha Hong Kong 11,07 kg/ha ekili alan başına ortalama pestisit kullanmaktadır. Orta Amerika’da bulunan küçük bir ada ülkesi Saint Lucia ise 14,52 kg/ha kullanımı ile birim alanda en çok pestisit kullanılan ülke konumundadır. Avrupa ülkelerinde ise 10,28 kg/ha’lık kullanım ile Belçika ve Lüksemburg başı çekmektedir. Onları birim başına ortalama 10,11 kg/ha kullanım ile Hollanda takip etmektedir [93].

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de tarımsal ürünlere yönelik talepler nüfusun artmasına paralel olarak artış göstermektedir. Tarımda ürün kalitesini ve miktarını arttırmaya yarayan pestisit kullanımı, kapsamlı tarımın yanı sıra gelişmiş sulama yöntemi uygulamaları ve ihracat taleplerindeki artış sebebiyle yıldan yıla artış göstermektedir. Ülkemizde Akdeniz (%28) ve Ege (%23,9) bölgeleri pestisit uygulamalarının en çok yapıldığı başlıca tarım bölgeleridir. Bu bölgeleri %17,7’lik oranla Marmara bölgesi takip etmektedir. Fındık ve çay gibi ticari olarak büyük öneme sahip ürünlerin yetiştirildiği Karadeniz bölgesinde ise düşük pestisit kullanımı (%4,8) dikkat çekmektedir (Tablo 2.1) [94].

Tablo 2.1. Türkiye'de pestisit kullanımının bölgelere göre dağılımı

BÖLGELER	%
Akdeniz Bölgesi	28
Ege Bölgesi	23,9
Marmara Bölgesi	17,7
İç Anadolu Bölgesi	13,1
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	6,8
Doğu Anadolu Bölgesi	5,7
Karadeniz Bölgesi	4,8

Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre 2006 yılı pestisit kullanımı toplam 45.376 ton iken bu sayı 2020 yılında %24'lük bir artış göstererek 53.562' ye ulaşmıştır. Ülkemizde pestisit kullanımındaki en büyük pay %41 ile fungusitlere en küçük pay ise %5 ile akarasilere aittir. Fungusitleri, %22 ile herbisitler, %21 ile insektistler takip etmektedir (Şekil 2.6 ) [95].



Şekil 2.6. Türkiye'de kullanılan pestisit türleri ve kullanım yüzdeleri



## 2.3. Çalışmada Kullanılan Organizmalar ile İlgili Genel Bilgiler

### 2.3.1. *Allium cepa* L.

Yüksek bitki türleri, çevresel kirleticileri değerlendirmek için önemli genetik model organizmalar olmalarını sağlayan özellikler gösterilirler ve sıklıkla izleme çalışmalarında kullanılırlar. Ancak bu özellikler, sadece farklı ortamlardaki mutajenleri tespit etme hassasiyetinden değil aynı zamanda yapraklar, kökler ve polen gibi farklı organ ve dokulardaki hücrelerde nokta mutasyonlarından kromozom anomalilerine (KA) kadar birçok genetik sonucu değerlendirmenin de mümkün olmasıyla ilgilidir [96]. Çevresel kirleticilerin değerlendirilmesinde *Allium cepa* L., *Vicia faba* L., *Zea mays* L., *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum* L., *Crepis capillaris* L., ve *Hordeum vulgare* L. gibi yüksek bitki türleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *Allium cepa* ise bu türler içerisinde en sık kullanılan yüksek bitki türü olarak kabul edilmektedir.

Soğan olarak bilinen *Allium cepa*, *Allium* cinsine ait Amaryllidaceae ailesi içerisinde yer almaktadır. Bu tek yıllık bitkiler dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. *Allium cepa*'nın kromozomlarının sayıca az ( $2n=16$ ) fakat yapı bakımından büyük olması ve ön-mutajenleri tespit etmek için çok önemli bir oksidaz enzim sisteminin bulunması mutajenite testlerinde model organizma olarak tercih edilmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak bitki kökleri biyolojik testler için çok faydalı materyallerdir. Çünkü bu bitki köklerinin uç kısımları, su ve toprak ekosistemlerini kirleten kimyasallardan olumsuz yönde etkilenen ilk yapılardır. Bundan dolayı kök ucu sistemlerinin incelenmesi hızlı ve hassas bir metot olup iki seviyede gözlem yapılmaktadır. Makroskobik düzeyde büyümedeki düzensizlikler gözlenebilirken; mikroskobik düzeyde ise hücrelerdeki mitotik anormallikler tespit edilebilmektedir [97-99].

### *A. cepa* Taksonomisi

**Phylum (Şube):** Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler). Tohum oluşturan bu bitkilerin üreme organları çiçek şeklindedir. Gelişmiş iletim sistemlerine sahip olan bu bitkiler ileri vaskülü bitkiler olarak tanımlanmaktadır.

**Subphylum (Alt Şube):** Angiospermae (Kapalı Tohumlular). Kapalı bir odacı içerisinde gelişen tohum taslakları bulunmaktadır. Buğdaygiller, papatyagiller, baklagiller gibi önemli türleri içermektedir.

**Ordo (Takım):** Liliales. Tek çenekli bir çiçekli bitki takımındır.

**Familiya (Aile):** Liliaceae. Dünyanın her yerinde bulunmaktadır. Yumru soğanlı ya da rizomlu bitkilerdir.

**Genus:** *Allium*

**Species:** *Allium cepa*

### 2.3.2. *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*; Diptera takımına ait, tam başkalaşım (holometabol) geçiren ve meyve sineği ya da sirke sineği olarak da adlandırılan ökaryotik bir canlıdır. Bu organizma, sahip olduğu birçok avantajla genetik çalışmalarda sık sık kullanılır. Kültürünün kolay yapılması, deney hayvanları için optimum sıcaklık olan 21 °C’de yumurtanın ergin bireye kadar iki hafta gibi kısa sürede erişmesi, hızlı üremesi, dev kromozomlara sahip olması ve ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin ucuzluğu bu avantajlardan bazılarıdır. Bu organizma ilk olarak 1910 yılında, Thomas Hunt Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılmaya başlanmış olup, günümüzde genetik alanında sıklıkla kullanılan organizmalardan biridir. Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART); Graf ve çalışma arkadaşları tarafından fiziksel, kimyasal ve biyolojik maddelerin mutajenik ve rekombinojenik etkilerini belirlemek amacıyla geliştirilmiştir [100].

### 2.3.2.1. *D. melanogaster*'in genetik çalışmalardaki nemi

1. Genetik çalışmalarda kullanılan organizma, ilgilenilen özellik bakımından çeşitlilik göstermelidir. Bu eşitlilik, organizmanın farklı varyasyonlara sahip olması ve bu varyasyonların kolayca ayırt edilebilmesiyle belirlenir. *D. melanogaster*, doğal ve yapay varyasyonlara sahip bir organizmadır ve genetik çalışmalar için uygun bir model olabilir. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri, bu organizmanın farklı göz, kanat ve kıl tiplerini temel alır [101, 102].

2. Kontrollü aprazlama, araştırmacının gözetimi altında istenilen özellikleri taşıyan organizmaların aprazlanmasıdır. Uygulamalar esnasında araştırmacı, koşullardan birisini değişken, diğerlerini sabit tutarak deney ve kontrol grupları oluşturur ve bu Şekilde hedef özelliklerin nesiller boyu nasıl aktarıldığı gözlemlenir. *D. melanogaster*, kontrollü çaprazlama yapılabilen en ideal canlılardan biridir [103].

3. Araştırılmak istenen özelliklerin nesilden nesile nasıl aktarıldığını gözlemleyebilmek için, genetiksel çalışmalarda kullanılan canlının hayat döngüsünün kısa olması gerekir. *D. melanogaster*'de hayat devri çok kısadır. 25 C ± 1 ortam sıcaklığında yaklaşık 9-10 günde erginleşen birey yeniden remeye başlamaktadır [100].

4. Genetik çalışmalarda kullanılacak organizma, çok fazla sayıda yavru verebilmelidir. Böylece kalıtımla ilgili daha sağlıklı ve güvenilir bilgi edinilebilir. *Drosophila melanogaster* dişileri günde takriben 50 yumurta vermektedir [104].

5. Ayrıca *Drosophila*, deney hayvanı olarak seçilen organizmada olması gereken diğer birçok avantaja da sahiptir. Kolay yetiştirilmesi ve yaşamını sürdürmesi için gerekli olan besin, kimyasal madde ve saf malzemenin temin edilebilirliği ve ucuz olması da önemlidir. Ayrıca bu organizma herhangi bir uygulamadan önce eterle kolay bir Şekilde bayıltılarak, üzerinde istenilen işlemler yapılabilir [100].

6. Kanser, nöroloji ve renal hastalıklar, metabolizma bozuklukları ile yapısal anormallikleri belirleyen genlerin çoğunluğunun *D. melanogaster*'de homologlarının

bulunduğu ve insan hücre döngüleri ve düzenleyici yolakların birbirine benzer olduğu bilinmektedir [105].

### ***Drosophila* Taksonomisi**

**Phylum (Şube):** Eklem bacaklılar. Hayvanlar aleminin en büyük şubelerinden biri olarak bilinmektedir. Proteine bağlı kitinden oluşan eklemli bir iskeletin varlığı eklem bacaklıların ayırt edici özelliğidir.

**Subphylum (Alt Şube):** Mandibulata. Bu alt şubede birinci çift üyelerine mandibul adı verilen ağız parçaları mevcuttur.

**Super Classis (Üst Sınıf):** Hexopoda-Insecta. Eklembacaklılar şubesinde en bol bulunan sınıf olarak kabul edilmektedir. Bölümlere ayrılmış bir gövdede eklemli bacaklar ve dış iskeletleri bulunmaktadır. Vücut bölümleri; gözleri, ağız kısımlarını ve antenleri taşıyan bir baş, bacakların ve kanat çiftlerinin bulunduğu üç segmentli göğüs kafesi ve sindirim, boşaltım, üreme organlarını içeren abdomen olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır.

**Clasis (Sınıf):** Pterygota. Gerçek sineklerin bulunduğu kanatlı böcekler sınıfı olarak tanımlanmaktadır.

**Ordo (Takım):** Diptera. Çok yaygın bulunan bir böcek takımıdır. Bir çift kanat bulundurmaktadır. Arka kanatları tokmağa benzeyen ve halter adı verilen denge organı olarak bilinmektedir. Bu organ diğer böceklerden kolaylıkla ayırt edilebilmelerini sağlamaktadır.

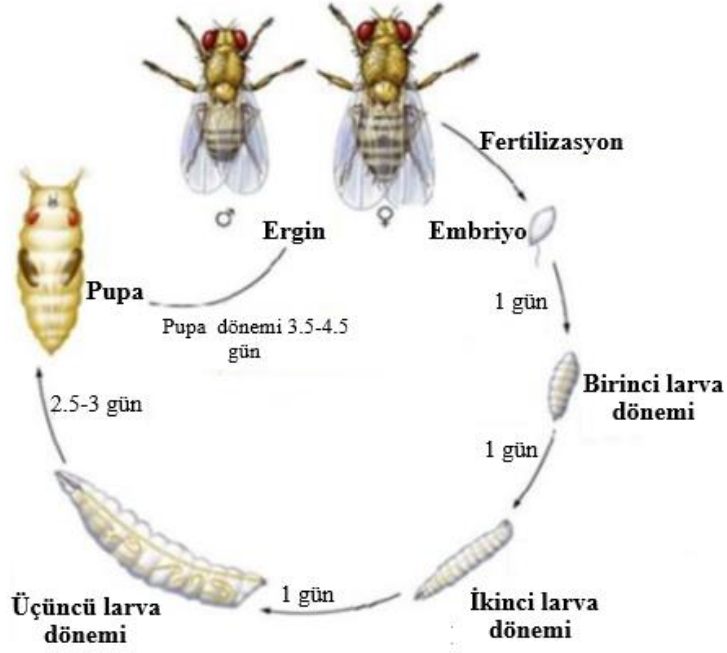
**Familya (Aile):** Drosophilidae. Çürümüş veya çürümekte olan meyvelerin etrafında yetişen ve boyları 3 ila 4 mm olan sineklerdir.

**Genus:** *Drosophila*

**Species:** *Drosophila melanogaster*

### 2.3.2.2. *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü

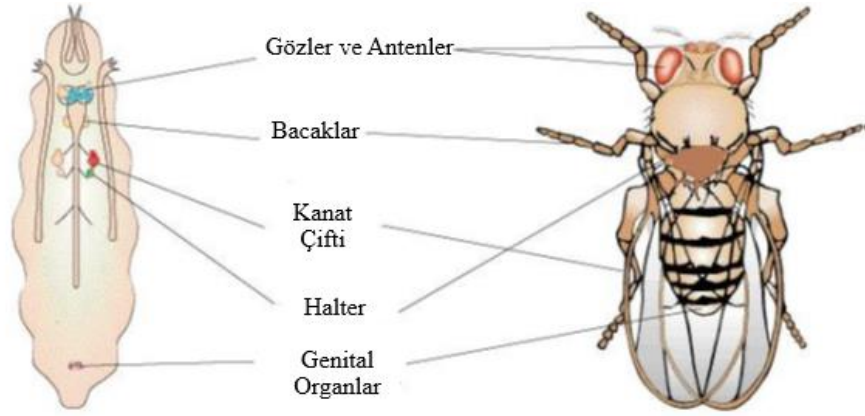
*Drosophila melanogaster* tam başkalaşım (holometabol) gösteren kanatlı bir böcek türü olarak bilinmektedir. Hayat döngüsünde tam başkalaşım geçiren tüm böcek türlerinde olduğu gibi embriyonik dönem, larva, pupa, ergin olmak üzere dört farklı evre görülmektedir (Şekil 2.7). Yumurtadan çıkan larvaların 10 gün içerisinde ergine dönüştükleri kaydedilmiştir [100]. *Drosophila* ergin dişi bireyler eşeysel olgunluğa ulaştıklarından itibaren ergin dönem süresince yaklaşık 300 yumurta bırakmaktadır. Bu yumurtaların olgunlaşarak yeni kuşaklar oluşturma oranı çok yüksektir. *Drosophila* gelişim sürecinde embriyonik ve post embriyonik olmak üzere iki dönem görülmektedir. Embriyonik dönem uterusda döllenmiş yumurtadan birinci evre larvaların çıkması ile son bulmaktadır. Post embriyonik dönem ise larva ve pupa evrelerinin gerçekleştiği dönemdir. Post embriyonik dönemde *Drosophila* ergin bireylerinin vücut yapıları oluşmaktadır. Ayrıca *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü ve ömür uzunluğu çevresel birçok faktör (popülasyon yoğunluğu, ortam sıcaklığı, bağıl nem) tarafından olumsuz anlamda etkilenmektedir.



Şekil 2.7. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü [106]

*D. melanogaster* dişileri pupadan çıktıktan 4 ya da 5 saat sonra eşeyssel olgunluğa ulaşırken; 2-3 gün içerisinde yumurta bırakmaya başlamaktadır. Dişi bireylerde yumurtlama erken dönemlerinde (6-10 gün) en st seviyeye çıkar ve bu dönemden sonra geometrik olarak sabit hızla azalmaktadır. Yumurtanın döllenmesi uterusu gerçekleşir ve dişi yumurtalarını ya döllenmeyi takiben hemen besiyerine bırakır ya da embriyo gelişiminin ilk dönemlerini uterusu geçirir. Döllenmiş bir yumurta, açık sarı ya da beyaz renkte olup genellikle şeffaf ve oval morfolojiye sahiptir. apı 0.2 mm uzunluğu ise 0.5 mm olarak hesaplanmıştır. Yumurtalarda, koriyon olarak bilinen ve yumurtayı dış etkenlerden koruyan ince bir zar tabaka bulunmaktadır. Yumurtaların st n kısmında iki adet filament bulunmaktadır. Bu ipliksi yapılar bırakıldığı ortamlarda saplanmasına ve batmasına engel olarak yumurtanın gelişimine önemli katkı sağlamaktadır [107].

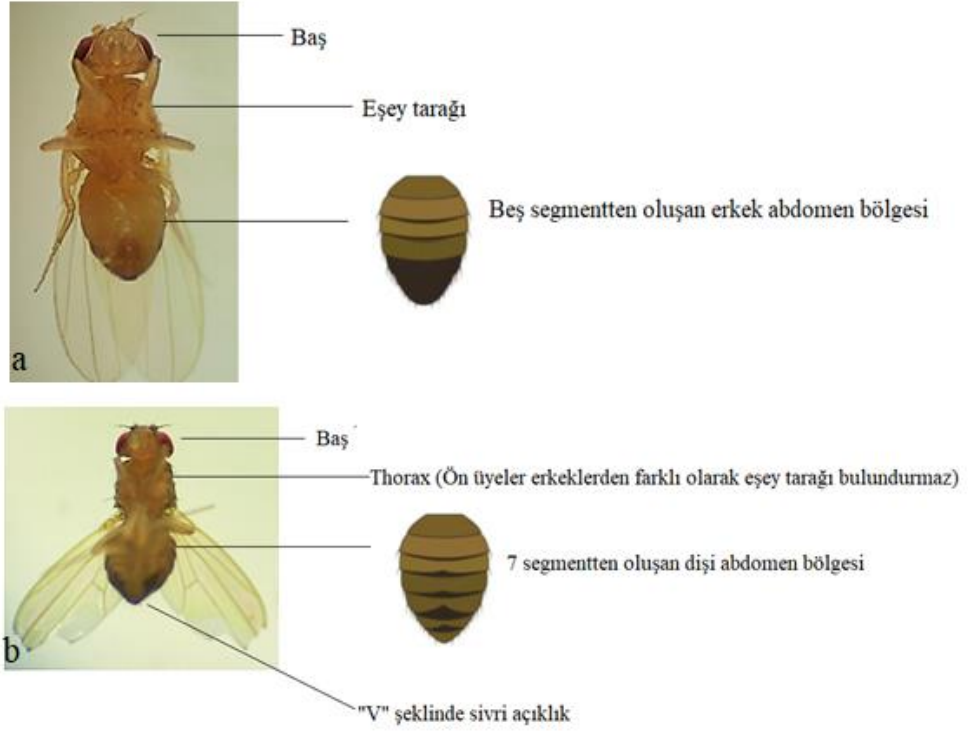
*D.melanogaster* gelişim aşamasında  instar dönem görülmektedir. Larvaların yumurtada çıkması ve ilk deri değişimi 1. instar dönem olarak bilinmektedir. Bu dönem 1 gün sürmektedir. Larvanın ilk deri değişimi ve ikinci değişim arasındaki 1 günlük süreç 2. instar dönem olarak kabul edilmektedir. Ortam şartlarına bağlı olarak 2 ya da 3 gün süren ve ikinci deri değişiminden pupa evresine kadar geçen süreç ise 3. instar dönemdir. Larvaların 3. İstar dönemde 4-4,5 mm uzunluğuna ulaştığı görülmektedir. Larva evrelerinde mitoz bölünme ile sürekli çoğalan ve pupa evresinde ergin bireylerin vücut yapılarının oluşumundan sorumlu imajinal disk olarak bilinen hücre grupları bulunmaktadır. Bu hücresel yapılar, larva evrelerinde devamlı mitoz bölünme ile pupa evresine kadar çoğalmaktadır. İmajinal disk hücreleri pupa evresinde ergine dönüşecek bireylerin kanat, bacak, göz, genital organ gibi yapıların oluşmasından sorumludur (şekil 2.8) [108].



Şekil 2.8. İmajinal disk hücreleri tarafından oluşturulan *Drosophila melanogaster* vücut yapıları [109]

Ergin bireyler oluşmadan önceki son evre pupa evresi olarak bilinmektedir. Son evre larvalar erken pupa (prepupa) evresine girerek buldukları ortamların kuru bölgelerine doğru hareket etmektedir. Bu bölgede dış zarında sarı- kahverengi puparyum denilen bir sert bir tabaka oluşarak pupa evresine geçmektedir. Başlangıçta yumuşak yapılı olan pupa iki saat içinden beyazdan açık kahverengine dönmektedir [110, 111]. Pupa rengi, ergin bireyin oluşmasına yakın bir zamanda açıktan koyu kahverengi tona dönmektedir. Pupadan ergin bireylerin çıkması ortamın şartlarına göre 4 ila 5 gün arasında değişmektedir [108, 112]. Bu gelişim döneminde sineğin kanat kısımları ve göz noktaları ayırt edilebilir duruma gelmiştir [113].

Pupadan çıkan ergin *Drosophila melanogaster* vücudu baş, thorax (göğüs) ve abdomen olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Baş bölümü gözler, antenler ve ağız parçalarını; thorax ise kanat çiftine ve bacaklarda içermektedir. Sindirim ve üreme organları ise abdomende bulunmaktadır [108]. Abdomenin segment yapısı ve büyüklüğü *Drosophila melanogaster* erkek ve dişi bireylerin ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Dişi bireylerde abdomen yumurta oluşumu nedeniyle daha büyük ve geniş yapıda ve yedi segmentten oluşmaktadır. Erkek bireylerin abdomeni ise beş segmentten oluşup dişi bireylerden daha küçük yapıdadır. Ayrıca dişi bireylerde abdomen V şeklinde yani sivri ve açık renkli erkeklerde ise küt ve koyu renk olarak görülmektedir. Thorax bölgesinde bulunan bacaklarda erkek ve dişi bireylerin ayırt edilmesinde önemlidir. Eşey tarağı adı verilen ve erkek bireylerin ön bacak çiftlerinde bulunan koyu kıllar mikroskop altında kolaylıkla görülerek cinsiyet ayrımı yapılmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 2.9) [114].



Şekil 2.9. *D. melanogaster* ergin bireylerde cinsiyet ayrımını sağlayan yapılar (a. Erkek birey, b. Dişi birey)

## 2.4. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite testleri, terapötik ilaçlar, kozmetik ürünler, pestisitler, endüstriyel bileşikler, gıda katkı maddeleri, doğal toksinler ve nanomateryallerin olumsuz etkilerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu testler, farklı in vitro ve in vivo metodolojileri kullanarak, nokta mutasyonları, kromozomların sayısındaki ve yapısındaki değişiklikler gibi çeşitli hasarları değerlendirme imkânı sağlar [115].

Kardeş Kromatit Değişimi (KKD), DNA replikasyonu sırasında iki kardeş kromatitin parçalarının ayrılmasını ve tekrar birleştirilmesini içeren bir süreçtir. Bu süreçte, çoğaltılan kromozomlardaki ana iplikler fiziksel olarak değiştirilir. Genellikle homolog rekombinasyon yoluyla gerçekleşen bu karşılıklı değişim sırasında bilgi değişimi olmadığı için bu süreç koruyucu ve hata yapmayan bir süreç olarak kabul edilir. KKD, radyoaktif olmayan tespit yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla laboratuvar toksikoloji testlerinde potansiyel genotoksin/mutajen belirteçleri olarak kullanılmıştır. KKD testinde, memeli hücreler bir ajanla işlenir ve 5-Bromo-2-deoksirüidin (5-BrdU) içeren ortamlarda



iki replikasyon döngüsü boyunca büyütülür. Hücreler, mitozun metafaz evresinde (c-metafaz) hücreler bölünmesini durdurmak için iğ ipliğini inhibe eden kolşisin gibi bir maddeye maruz bırakıldıktan sonra toplanır ve kromozomlar floresan artı Giemsa (FPG) prosedürü ile gözlem için hazırlanır [116, 117].

Bakteriyel geri mutasyon testi (AMES), ekzojen maddelerin mutajenik özelliklerini değerlendirmek için kullanılan bir test yöntemidir. Bu testte, *Salmonella typhimurium* veya *Escherichia coli* mutant bakteri suşları kullanılır. Bu suşlar, histidin veya tryptophan operonlarının farklı bölgelerinde çeşitli mutasyonlara sahiptirler. Bu testin esası, *S. Typhimurium*'un histidin sentez yeteneğini kaybetmiş mutant suşlarının, test maddesiyle muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidin sentez yeteneğini geri kazanmasına ve histidinsiz bir ortamda çoğalabilmesine dayanır. Histidinsiz bir ortamda çoğalabilen kolonilerin sayılmasıyla mutajenitenin derecesi belirlenir. Bu test sistemi, kolay uygulanabilir ve ekonomik olduğu için kimyasal maddelerin güvenilirliğinin değerlendirilmesinde sıkça tercih edilir [118, 119].

Comet test yöntemi, kimyasalların DNA'da neden olduğu hasarların tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin temeli, negatif yüklü DNA fragmanlarının bir agaroz jel üzerinde elektrik alanında göç etmelerine dayanmaktadır. Comet tekniğinin en önemli avantajları, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını dahi ayırt edebilmesi, çeşitli doku ve hücre tiplerinde uygulanabilmesi, her uygulama için az sayıda hücrenin yeterli olması, hızlı sonuç elde edilmesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenebilmesidir [120, 121].

Kromozomal Anormallik (KA) testi, kanser ve çeşitli insan genetik hastalıklarının neden olan maddeleri değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu maddeler, delesyonlar, kromozom veya kromatid kırıkları ve translokasyonlar gibi anormal kromozom oluşumlarına yol açabilen toksik maddeleri içerir. KA testi, bu maddelerin etkilerini incelemek için hem canlı organizmalarda (in vivo) hem de laboratuvar kültürlerinde (in vitro) kullanılabilir. Anormalliklerin varlığı, uygun boyama prosedürlerinin ardından mikroskop kullanılarak analiz edilir [115]. Ancak KA testi, kromozomal anormallikleri tespit etmek için teknik olarak zorlu ve zaman alıcı bir süreç olarak kabul edilmektedir.

Mikronukleus (MN) genellikle anafaz sırasında oluşur. Bu, kromozomların veya kromozom parçalarının, doğru bir şekilde iğ ipliği ile bağlanamadıkları için hücre çekirdeklerine dahil edilememesi sonucunda meydana gelir [122]. Bu taşınmış kromozom parçaları veya kromozomlar sonunda bir çekirdek zarı ile kaplanır ve standart çekirdek boyamasından sonra çekirdek ile benzer bir yapıya sahiptirler, ancak daha küçüktürler. MN testi sonuçlarını değerlendirmek, KA testine kıyasla çok daha kolay ve hızlı bir tekniktir [123]. İn vitro ve in vivo MN testleri, kromozomal düzeyde çeşitli DNA hasarlarını tanımlamak için hızlı ve son derece güvenilir yöntemlerdir, özellikle genotoksik hasar riskinin değerlendirilmesi için kullanışlıdır [124].

## **2.5. Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri**

### **2.5.1. Allium test yöntemi**

Allium test yöntemi, kimyasalların genotoksisitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ilk olarak Levan tarafından *A. cepa* iğ iplikleri üzerindeki kolsişin maddesinin etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır. Fiskeşjö ise bu yöntemi ilerleterek *A. cepa*' da eksik mutajen etkiye sahip polisiklik aromatik hidrokarbonları metabolize eden oksidaz enzim sisteminin varlığını kanıtlamıştır [125]. Rank ve Nielsen, tarafından yapılan bir çalışmada, farelerde kanserojenliğin tespit edilmesinde kullanılan Allium testinin, diğer genotoksisite testleri ile yüksek bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur [126]. Bu bulgular, bir test maddesinin genotoksisitesinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla Allium testinin diğer genotoksisite testleri ile kullanılabileceğini göstermektedir [127].

Allium testinin birçok avantajı bulunmaktadır. Ucuz ve oldukça kolay uygulanan bu yöntem ile bir maddenin genotoksisitesi kısa sürede tespit edilmektedir. Hassas olan Allium testi düşük seviyelerdeki genotoksisiteyi bile tespit edebilmektedir. Allium test yöntemi kimyasal güvenliğin değerlendirilmesinde standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Allium testi ile mitotik indeks (Mİ), kromozom anormallikleri (KA),

çekirdek anormallikleri (NA) ve mikronukleus (MN) gibi çeşitli parametreler aynı anda değerlendirilebilmektedir [128].

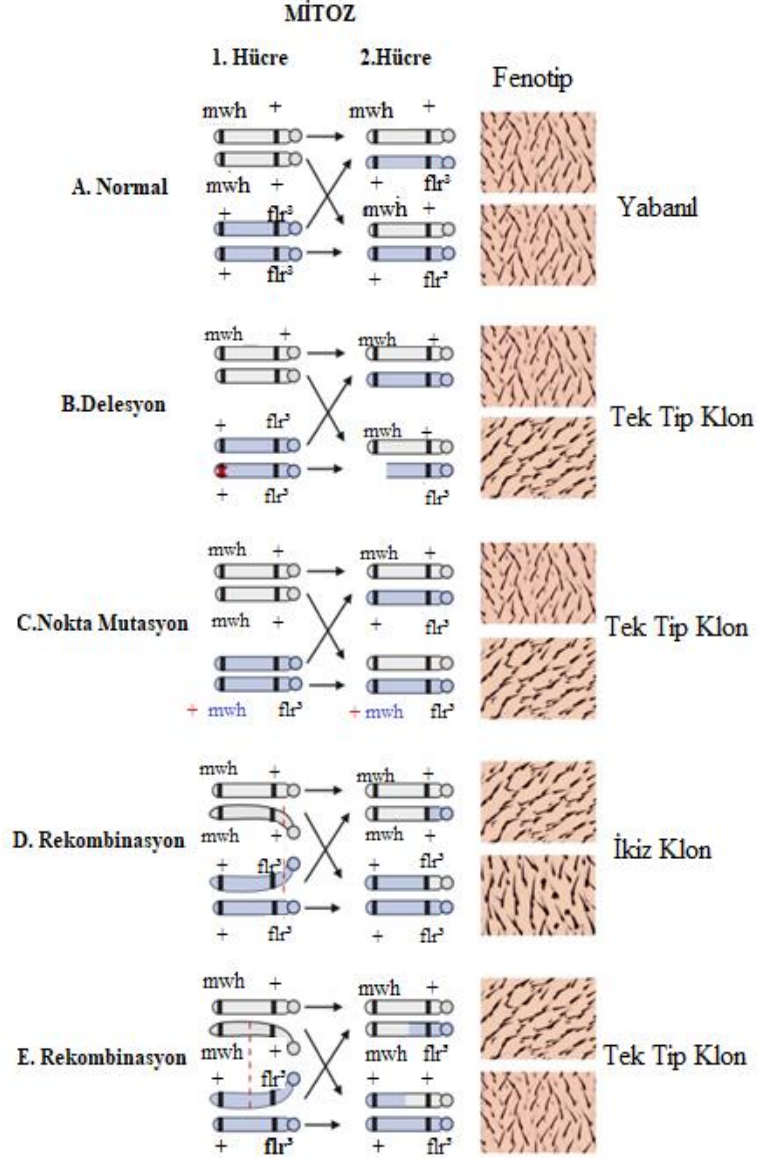
### 2.5.2. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Test Yöntemi (SMART)

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), maddelerin olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla *Drosophila* soylarının kullanıldığı kısa zamanlı bir test yöntemi olarak bilinmektedir. SMART yöntemi, larva gelişimi sırasında uygulanan bir mutajenin kanat imajinal disk hücrelerinde gen hasarını artırması sonucu heterozigotluğun kaybedilmesi esasına dayanmaktadır [100]. *Drosophila* larvalarında farklı vücut yapılarının oluşumundan sorumlu 19 imajinal disk bulunmaktadır. İmajinal disk hücreleri larval gelişimin ilk evresinde 50-100 kadarken 10 saate bir çoğalarak 3. evrede 24.400' e kadar ulaşmaktadır [129, 130]. İmajinal disk hücrelerindeki hızlı çoğalma genotoksinlerin larva genomu ile etkileşim ihtimalini artırarak, SMART'ın duyarlı bir genotoksisite testi olmasını sağlamaktadır [131]. Transheterozigot larvalardaki imajinal disk hücrelerinin ileride ergin bireylerin organ ve yapılarını oluşturacağından dolayı test edilen kimyasal maddeler imajinal disklere etki ederek bireyin gelişiminde ortaya çıkması muhtemel olan nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, kromozom bozuklukları ve rekombinasyonların belirlenmesine imkân vermektedir [132].

Mutasyon sonucu heterozigotluğun kaybedilmesi yabancı fenotipi etkileyerek mutant fenotip oluşmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.10). Mutant fenotip, kanatlarda farklı benek grupları olarak görülmektedir. Bu benekler; 1-2 mwh hücresi veya 3 ve üçten fazlasını taşıyorsa tek tip klon (tekli benekler), mwh ve flare klonlarını (aralarında yabancı trikrom bulunmadan) bir arada bulunduruyorsa ikiz klon (ikili benek) olarak sınıflandırılmaktadır [133].

İkiz klonların mikroskopik analizi sırasında dikkat edilmesi gereken bir husus bulunmaktadır. Bazı durumlarda aynı sektör içerisinde birbirine yakın olan mwh ve flr<sup>3</sup> klonların birbirine komşu iki klon ya da ikiz klon şeklinde ayrımı yapılmaktadır. Bu durumlarda iki klon arasında üç ya da daha fazla sayıda yabancı tip trikrom hücre

gözlemleniyorsa bunların birbirine komşu klonlar olarak değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir [132].



Şekil 2.10. SMART yönteminde tek tip ve ikiz klonların oluşum mekanizması [100]

### Kullanılan Hatların Genel Yapısı

**mwh/mwh:** Tek bir hücreden birkaç tane kanat kılı (trikom) çıkması sebebiyle multiple wing hair (mwh) yani çoklu kanat kılı olarak anılan mutant bir soy olarak bilinmektedir. Mwh üçüncü kromozomun sol kolunda ve uca yakın bir noktadaki bir mutasyonla

oluşmaktadır. Homozigot mwh soyu olarak yaşatılabilir ve bu durumda kanat hücrelerinde hücre başına bir trikoma olması gerekirken çoklu trikoma oluşmaktadır [111].

**flr<sup>3</sup> / ln (3LR) TM3, ri pP sep l (3) 89Aa bx34S eS BdS:** Üçüncü kromozom üzerindeki flr<sup>3</sup> geninde meydana gelen mutasyonlar alev şeklinde kanat trikomlarına sebep olmaktadır. Resesif bir mutasyondur ve oluşan üç mutant allel flr<sup>3</sup> homozigot durumda yaşamamaktadır. Ancak kanat imaginal disklerindeki homozigot hücreler yaşayarak mutant kanat hücrelerine gelişmektedir. Homozigot letalite, kanat kenarlarının serrata (testere) şeklinde olmasına sebep olan baskın Bd<sup>S</sup> genindeki mutasyonla heterozigot olarak dengelenmektedir. Flr<sup>3</sup> fenotipinde kanatlardaki kıllar normal, düz ve uzun kıllar şeklinde iken, mutasyon halinde kalın ve düzgün olmayan kısalmış, nokta veya koyu renkli balon şeklinde kıllar yapıları olarak kendisini gösterebilir [100].

Bd<sup>S</sup> (beaded-serrata) geni baskın bir gen olup TM3 dengeleyici kromozom üzerinde yer almaktadır ve homozigot durumda letal etki göstermektedir. Normal bir *D. melonagaster* bireyinde kanatlar düzgün kenarlı iken Bd<sup>S</sup> genini taşıyan bireylerde ise kanat testere şeklindedir [102]. Bu geninin ortaya çıkarttığı fenotipik farklılık, bireyin TM3 dengeleyici kromozomu taşıyıp taşımadığına işaret etmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Normal ve Serrat (Testere Dişli) Kanatların Gösterimi

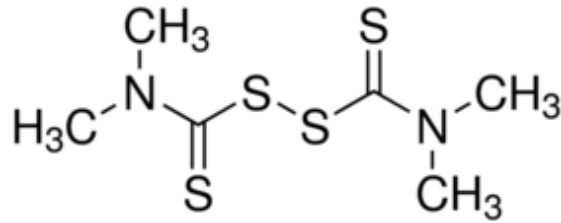
## 2.6. Çalışmada Kullanılan Pestisitler Hakkında Bilgiler

### Fertiram

Fertiram, etken maddesi %80 Thiram (tetrametilthiuram disulfid) olan sentetik fungusitlerin dithiokarbamat sınıfında bulunmaktadır. Suda dağılılabilen toz (Thiram 80 WG) ve akıcı konsantre (Thiraflo FS) olmak üzere iki yapıda formüle edilmiştir. Elma, armut, şeftali, kiraz ve çilekte mantar hastalıklarının kontrolü için yaprak üzerine püskürtülerek; mısırdaki fide hastalıklarının önlenmesi için tohum tedavisi şeklinde uygulanmaktadır [134].

Tablo 2.2. Thiram'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri

<b>Ticari Adı</b>	Thiram 65, Thiram 75, Thiram Granuflo, Defiant, Fertiram
<b>Kimyasal Adı</b>	Tetrametilthiuram disulfid
<b>Kapalı Formül</b>	$(CH_3)_2NCSS_2CSN(CH_3)_2$
<b>Molekül Ağırlığı</b>	240, 43g/mol
<b>Erime Noktası</b>	142-150°C
<b>CAS Numarası</b>	137-26-8



Şekil 2.12. Thiramın açık kimyasal formülü

Thiram, hücrelerde oksidatif stresin engellenmesinde önemli görevleri olan organik bileşiklerin çalışmasını engellemektedir. Örneğin sülfhidril grubunda birçok enzimi inhibe ederek bu bileşiğin hücredeki indirgeyici görevini yapmasına engel olmaktadır. Thiram, hücrelerde doğal olarak bulunan bir antioksidan olan glutatyonun da işlevini

bozmaktadır. Cu (bakır) ile birleşerek serbest radikallerin oluşumunu katalizler ve bu şekilde glutasyonu okside ederek çalışmasını durdurur. Transkripsiyon faktörlerinde NF-kB inaktive ederek de etkili olmaktadır. İnaktive olan NF-kB DNA ya bağlanamaz bunun sonucunda apoptosis tetiklenir ve peptid amidasyonu artar. Thiramın sebep olduğu oksidatif stres mitokondriyal geçirgenliğe de sebep olmaktadır [135].

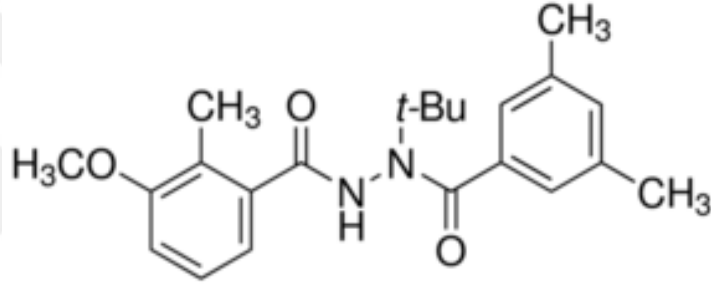
Thirama maruz kalma yolları ve buna bağlı olarak toksisite derecesi sınıflandırılmıştır. Buna göre thiram oral yoldan düşük (Toksosite Kategorisi III), dermal yoldan ise orta derecede (Toksosite Kategorisi III) akut toksisite sergilemektedir. Solunum yoluyla thiram maruziyeti orta derecede toksik olarak kabul edilmektedir. Gözlerde yanma kaşınma gibi tahriş edici etkileri orta derecede (Toksosite Kategorisi II) kaydedilirken cilt üzerinde hafif derecede (Toksosite Kategori IV) etki göstermektedir. Thiramın sinir sistemi üzerindeki etkileri laboratuvar hayvanları üzerinde çalışılmıştır. Thiram, bu hayvanlar üzerinde uyumsuzluk, motor becerilerde azalma gibi birtakım nörotoksik etkiler göstermiştir. Ayrıca bu hayvanlarda gelişimsel etkiler ve ciddi fetal malformasyonlar tespit edilmiştir. Sıçanlarda ve farelerde yapılan karsinogenisite çalışmalarında ise Fertiram önemli bir karsinogenik etki göstermemiştir [136].

### **Winsor**

Winsor, etken maddesi 240 gr/l Methoxyfenozid (N-tert-butyl-N0-(3-methoxy-o-toluoyl)-3,5-xylohidrazide) olan yeni bir insektisit grubu olan diasilhidrazinlerin içerisinde yer almaktadır. Methoxyfenozid, yer seviyesinde elle püskürtme, havadan uçakla püskürtme gibi standart püskürme yöntemi veya sulama sistemi aracılığıyla yapılan yöntemler kullanılarak uygulanmaktadır. Methoxyfenozid düşük akut oral, dermal ve solunum toksisitesi göstermektedir. Gözlerde çok az tahrişe sebep olmaktadır ancak cildi tahriş eden bir toksisiteye sahip değildir. Methoxyfenozid uygulandıktan sonra topraktan süzülme, erozyon ve döküntü gibi yollarla uygulama yerinden ayrılma potansiyeline sahiptir. Methoxyfenozidin topraktaki bu mobilitesi sucul ekosistemlere karışmasını kolaylaştırmaktadır [137, 138].

Tablo 2.3. Methoxyfenozid'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

<b>Ticari Adı</b>	Winsor, Falcon, İntegro, İnterpid, Prodigy, Runner
<b>Kimyasal Adı</b>	N'-tert-butyl-N'-(3,5-dimethylbenzoyl)-3-methoxy-2-methylbenzohydrazide
<b>Kapalı Formül</b>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molekül Ağırlığı</b>	368,5 g/mol
<b>Erime Noktası</b>	206.2- 208 °C
<b>CAS Numarası</b>	161050-58-4



Şekil 2.13. Methoxyfenozid'in açık kimyasal formülü



### 3. BÖLÜM

#### MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada Thiram ve Methoxyfenozid pestisitlerinin olası genotoksik etkileri Allium test yönetimi ve Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon test yöntemi (SMART) ile araştırılmıştır.

Thiram ve Methoxyfenozid'in;

Allium test yöntemi ile pestisitlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı soğan kök uçlarından hazırlanan preparatlardan mitotik indeks (Mİ) ve kromozom hasarlarının tespit edilmesi; SMART yöntemi ile pestisitlere maruz bırakılan  $72 \pm 4$  saatlik  $mwh/flr^3$ ,  $mwh/TM3, Bd^S$  transheterozigot larvalarının ergin hale gelen bireylerinin kanat fenotiplerinde oluşan mutasyonların tespit edilerek iki farklı organizmadaki genotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Tüm deneyler laboratuvar koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Allium test yönteminde soğanların çimlenmesi karanlık ortamda gerçekleştirilirken; SMART yönteminde larvalar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda bırakılarak ergin bireyler elde edilmiştir. SMART yönteminde sadece pestisitlerin konsantrasyonları uygulanırken hazır besiyer kullanılırken *Drosophila* stok kültürleri için ise standart besiyer kullanılmıştır. Standart besiyer hazırlanışı detaylı şekilde anlatılmıştır.

#### 3.1. Allium Test Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Allium test yönteminde kullanılan kimyasalların kullanım amaçları ve miktarları aşağıda belirtildiği gibidir.

1N HCl çözeltisi: Bitki kök uçlarının yumuşatılması ve kromozomların daha net bir şekilde görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılan bir çözeltidir. 82,81 mL HCl 1000 ml su ile tamamlanarak hazırlanır.

Fiksatif Çözelti: Hücrelerdeki kromozomların ve diğer hücrel yapıların doğal yapısını korumak amacıyla tercih edilir. 3:1 oranında metanol ve asetik asidin karıştırılması ile bu çözelti elde edilir.

%45'lik Asetik Asit: Hücrelerin canlı yapısını korumak, kromozomları daha net gözlemlemek ve analiz etmek amacıyla kullanılır. Bu çözelti, 55mL suya 45 mL asetik asit eklenerek hazırlanır.

%70'lik Etil Alkol: Bitki kök uçlarının uzun süre depolanmasını kolaylaştırır. 73 mL etanol (%96'lık) 27 mL suya eklenerek hazırlanır.

Schiff's Reagent Boyası: Bitki kök uçlarının boyanması böylelikle kromozomların rahatça görülmesine olanak sağlar.

Entellan: Preparat hazırlanması aşamasında kullanılır.

### **3.2. SMART Yönteminde Kullanılan Kimyasallar**

Smart yönteminde kullanılan kimyasallar aşağıda belirtilmiştir.

Agar Agar: Standart besiyeri yapımı aşamasında kullanılır.

Asetik Asit: Kontaminasyonu engellemek amacıyla hazırlanış aşamasında standart besiyere eklenir.

Faure Solüsyonu:  $72\pm 4$  saatlik transheterozigot larvalara pestisit uygulaması sonucu elde edilen kanatları daimî preparat haline getirmek için kullanılmaktadır. Karıştırma kabına önce 50 mL distile su eklenir. Ardından, bu suyun içerisine sırasıyla 30 gr gum arabic (Arap Zamk), 50 gr kloral hidrat ve 20 mL gliserol eklenir. Malzemeler iyice karıştırılarak homojen bir karışım elde edilir. Karışım, filtre kağıdı üzerine alınarak başka bir kabın

içerisine süzülür. Elde edilen bu şeffaf ve pürüzsüz solüsyon, kanatların kalıcı preparat haline getirilmesi için kullanıma hazır hale gelir.

### **3.3. *Drosophila* Kültür Stoklarının Devamlılığı İçin Standart Besiyer Hazırlanması**

124,8 gr mısır unu ve 112,8 gr şeker hassas terazide tartılarak bir kaba aktarıldı. 600 mL distile su bu kaba yavaşça eklenerek bir kaşık yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra belirli bir sıra olmadan 22,8 gr maya ve 7,2 gr agar bu kaba eklenerek üzerine 600 mL su daha ilave edilerek 1200 mL tamamlandı. Hazırlanan bu karışım kısık ateşte yoğunlaşıp kıvam alana kadar yavaşça pişirildi. Pişirme işlemi sırasında topaklanma olmaması için karışım sürekli karıştırıldı. Karışım kaynamaya başlayınca üzerine 7,2 mL asit eklenerek bir süre daha kaynatıldı. İyice yoğun bir kıvam alan besiyer hazır hale geldi.

Hazırlanan besiyer sıcak bir şekilde 330 mL'lik şişelere 2-2,5 cm olacak şekilde döküldü. Aktarım yapılan şişelerin steril olması gerekmektedir. Bu sebeple şişeler birkaç gün önceden otoklav içerisinde steril edildi. Steril edilmeyen şişelerde istenmeyen organizmaların çoğalması çok olasıdır. Bu durum *Drosophila melanogaster* larvalarından ergin bireylerine kadar tüm yaşam döngüsüne olumsuz etki ederek deney sonuçlarını etkilemekte hatta olası yayılma durumunda tüm kültür stoklarının kaybedilmesine yol açabilmektedir.

Şişelere aktarılan besiyerin üzeri bir kurutma kâğıdı ile kapatılarak bir gün süreyle kurumaya bırakıldı. Kuruyan besiyer artık stokların çoğaltılması için hazır durumdadır.

Günlük besiyer stokların korunması ve çoğaltılması için yapılırken; transheterozigot larvalara pestisit uygulanması aşamasında *Drosophila* İstant Medium hazır besiyer kullanıldı.

### 3.4. Allium Test Yönteminin Uygulanması

Allium test yöntemi Fiskeşjö tarafından belirlenen standart uygulama protokolünde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi [125]. Çalışma materyali olarak, yaygın bulunan yüksek yapılı bitkilerden *Allium cepa* (soğan) seçildi.

Thiram ve Methoxyfenozid'in uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi aşamasında farklı konsantrasyonların etkileri denendi. Denemeler sırasında Thiram için 0,0625 gr/L, 0,08 gr/L, 0,125 gr/L, 0,25 gr/L, 0,5 gr/L ve 1 gr/L 3 gr/L, 5 gr/L konsantrasyonları; Methoxyfenozid için ise 0,0001 ml/L, 0,005 ml/L, 0,001 ml/L, 0,002 ml/L, 0,005 ml/L, 0,1 ml/L ve 0,2 ml/L kullanıldı. Yüksek konsantrasyonlarda, soğan köklerinde herhangi bir uzama gözlenmedi. Düşük konsantrasyonlarda ise, negatif kontrol grubuyla benzer sonuçlar elde edildi. Sonuç olarak, Thiram'ın uygulama konsantrasyonları 0,25 gr/L, 0,5 gr/L ve 1 gr/L; Methoxyfenozid'in ise 0,005 ml/L, 0,001 ml/L, 0,002 ml/L olarak belirlendi.

Soğan kök uçlarına pestisitlerin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edildi. Süre sonunda kök uçları 1-2 cm kesilerek preparatlar hazırlandı. Distile su negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise metil metan sülfonat (MMS, 10ppm) kullanıldı. Çalışma basamakları üç tekrarlı olacak şekilde tamamlandı.

Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenerek pestisitlerin her konsantrasyonu için MI tespit edildi. Bölünme safhaları ve anomaliler kaydedilerek bazıları fotoğraflandı.

Çalışmada kullanılan soğanlar kuru bir yerde muhafaza edildi. Sonuçlarda dalgalanmaları engellemek amacıyla soğanların uygulama süresince karanlık ortamda çimlenmesi sağlandı.

#### 3.4.1. Genotoksik uygulama

Bu aşamada uygulama konsantrasyonları ve kontrol grupları için homojen ve iyi çimlenmiş 5 adet soğan seçildi. Soğanlar, uygulama konsantrasyonları ve kontrol grupları

ile doldurulan tüpler içerisinde 24 saat çimlenmeye bırakıldı (Şekil 3.1.). Negatif Kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak metil metan sülfonat (MMS) (10 ppm) kullanıldı. Tüm deneyler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. Uygulama ve kontrol gruplarındaki soğan kökleri 1-2 cm olacak şekilde kesildi ve 3:1 oranında alkol-glasiyal asit içerisinde 1 gece +4 °C de bekletildi. Ertesi gün asit içerisinde alınan soğan kökleri daimî preparat haline getirilene kadar %70'lik alkol içerisinde +4 °C de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Pestisitlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan soğan kök uçları

### 3.4.2. Preparat hazırlama

Soğan kök uçları içerisinde bulunduğu %70'lik alkol içeren ortamdan uzaklaştırıldı. Bunun için kök uçları distile su ile yıkandı ve fazla su kurutma kâğıdı ile alındı. Daha sonra fiksatif çözelti içine alınarak 30 dakika sürecek fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Süre bitiminde kök uçları fiksatif çözeltiden alınarak distile su ile yıkandı. Sonraki işlemde dokuları yumuşatarak hücre duvarlarının parçalanmasını sağlamak amacıyla kök uçları, 1N HCL içeren şaleler içerisinde 60° C lik su banyosunda 15 dakika maserasyon

işlemine tabii tutuldu. Bu işlem bitiminde kök uçları tekrar distile su ile yıkandı ve kurutma kâğıdı yardımıyla fazla su uzaklaştırıldı. Son aşamada kök uçları, küçük petrilerin içine alınarak 30 dakika boyunca Schiff-Reagent ile boyandı.

Preparasyon için hazır duruma gelen kök uçları temiz bir lam üzerine alındı. Materyal üzerine %45 Asetik asit çözeltisi damlatıldı ve lamel kapatılarak dokuların ezilmesi ve yayılması sağlandı. Daha sonra  $-40^{\circ}$  C buz kalıplar üzerinde 30 saniye bekletildi. Buz üzerinden alınan lam, ezilme işlemi yapılan lamelden bistüri yardımıyla ayrıldı. Ayrılan lam ve lamel %70'lik alkol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan lam üzerine bir damla entellan damlatıldı ve temiz bir lam ile kapatılarak daimî preparat haline getirildi. Ezme işleminde kullanılan lamel ise entellan yardımıyla temiz bir lam ile birleştirilerek daimî preparat haline getirildi.

### **3.4.3. Hazırlanan preparatların analizi**

Çalışmada kullanılan pestisitlerin etkilerini tespit etmek amacıyla toplam 5000 adet hücre 5 adet preparattan 1000'er tane olacak şekilde hücreler analiz edilmiştir. Analiz edilen hücreler içerisinde mitoz evreleri ve kromozomal anomaliler tespit edilerek kaydedildi. Bölünen hücrelerin, incelenen tüm hücrelerdeki frekansı ile mitotik indeks ve mitotik bölünmede tespit edilen evrelerin frekansları belirlendi. Kromozom anomalilerinin tespiti için ise her preparatta incelenen 100, toplamda 500 hücre analiz edildi. Belirlenen anomaliler Oympus (DP26) kamera ataçmanlı BX53 (Olympus) araştırma mikroskobu ile fotoğraflandı.

Allium testi deneylerinden elde edilen veriler IBM Statistics SPSS26.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Mitotik indeks ve toplam genetik hasar değerleri "Tek Yönlü Varyans Analizi" (One Way ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Kontrol ve deney gruplarına ait elde edilen ortalamaların farklılık gösterip göstermediği farklılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için ise gruplar arası karşılaştırılmalarda Tukey testi kullanıldı.

Mitotik İndeks = (Bölünen Hücre Sayısı) / (Toplam Hücre Sayısı) Sehgal vd. formülü ile belirlendi [139].

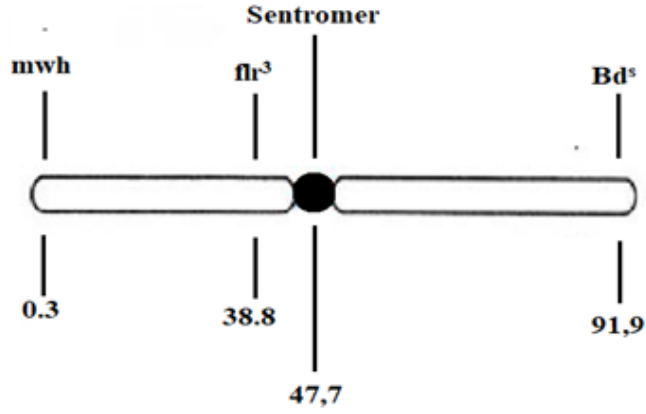
Faz indeksleri;  $Ifaz = (Faza\ ait\ hücre\ sayısı) / (toplam\ bölünen\ hücre\ sayısı) * 100$  Ivanova ve çalışma arkadaşları formülü kullanılarak değerlendirildi [140].

Genotoksisite indeksi (%) =  $100 \times (Gözlemlenen\ her\ türlü\ anormallik\ sayısı) / (toplam\ bölünen\ hücre\ sayısı)$  formülleri ile belirlendi [141].

### 3.5. Kanat Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

Somatik mutasyon ve rekombinasyon test yöntemi (SMART), göz ve kanat benek testleri olmak üzere iki ayrı test sistemine ayrılmaktadır. Çalışmamızda kanat benek testi kullanıldı. Kanat mutasyon testi Graf ve çalışma arkadaşları metoduna göre bazı küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi [100].

Kanat benek testinde, normal metabolik aktivite gösteren bireylerin kullanıldığı standart çaprazlama (ST); promutajenlere karşı oldukça duyarlı olan bireylerin kullanıldığı yüksek biyoaktivasyon çaprazlama (YB) olmak üzere farklı çaprazlamalar kullanılmaktadır. Çalışmada normal metabolik aktiviteye sahip multiple wing hairs (mwh, 3-0.3) erkek bireyler ile yüksek yumurta verimine sahip flare ( $flr^3$  3-38.8) virgin dişi bireyler standart çaprazlama için kullanıldı (Şekil 3.2). Mwh, normal tek tip trikomlar yerine hücre başına birden fazla trikomlar meydana getiren resesif bir mutasyon taşır (Şekil 3.15).  $Flr^3$  ise alev şeklinde kanat kıllarına sebep olan resesif bir mutasyondur (Şekil 3.16).  $Flr^3$  öldürücü özelliğe sahip 3 mutant allel bulundurur. Bu nedenle  $flr^3$  alleli, çoklu inversiyonlar taşıyan dengeleyici kromozom (TM3) ve kanat şeklini değiştiren homozigot öldürücü ( $Bd^S$  3-91.9) baskın bir marker üzerinde bulunur (Şekil 3.2).  $Mwh/flr^3$ ,  $mwh/TM3$ ,  $Bd^S$  çaprazlaması sonucunda fenotipte kolaylıkla ayırt edilebilen kanat yapılarına sahip ergin bireyler oluşmaktadır. Bunlardan ilki kanatlarının kenarları testere dişi gibi görünen serrat kanatlı dengeleyici-heterezigot bireyler diğeri ise normal (yabanıl) kanat kenarına sahip transheterezigot bireylerdir.



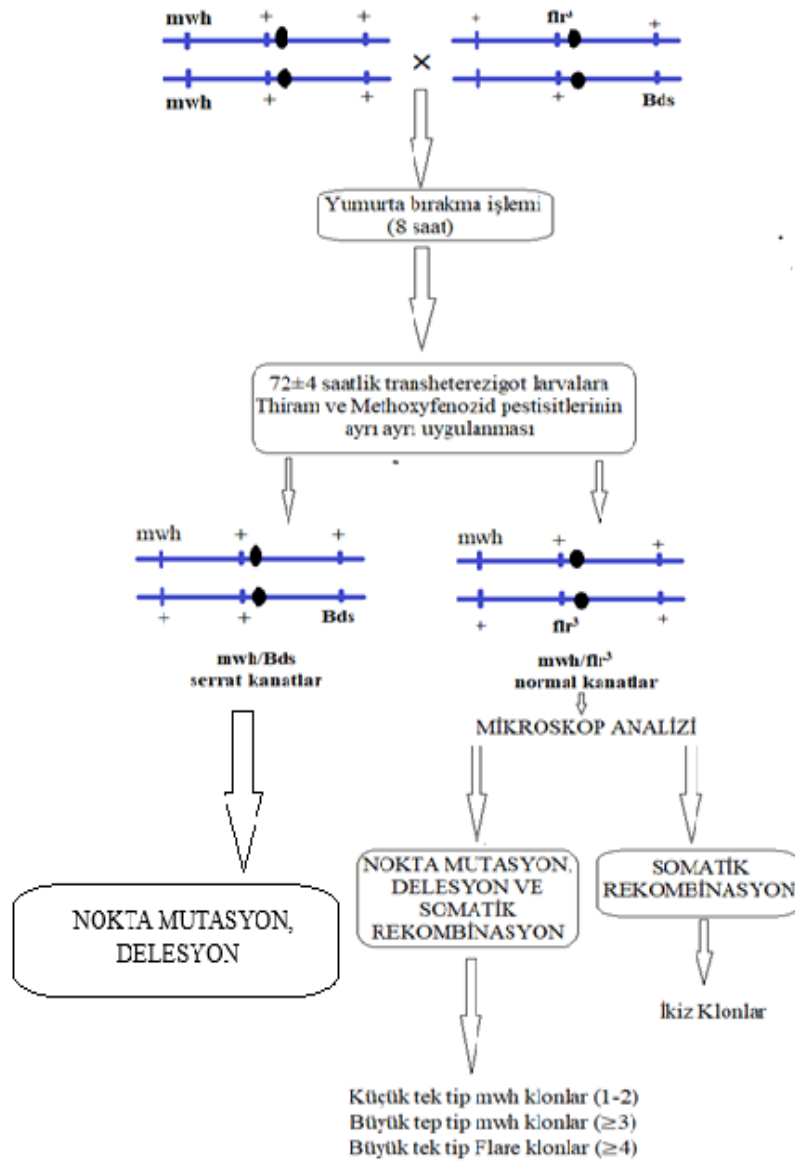
Şekil 3.2. Marker genlerin 3. Kromozom üzerindeki konumları

Deneyde ilk olarak Thiram ve Methoxyfenozid'in uygulama konsantrasyon değerleri belirlendi. Bunun için Thiram ve Methoxyfenozid'in uygulama konsantrasyonları geniş bir aralıkta test edildi. Thiram için kullanılan konsantrasyonlar 0,0000625 gr/L, 0,000125 gr/L, 0,00025 gr/L, 0,0005 gr/L, 0,001 gr/L, 0,005 gr/L; Methoxyfenozid için ise konsantrasyonlar 0,0125 ml/L, 0,025 ml/L, 0,05 ml/L, 0,1 ml/L, 0,2 ml/L, 0,4 ml/L, 0,8 ml/L olarak belirlendi. Her iki pestisit için yüksek konsantrasyonların daha fazla toksisite gösterdiği, düşük konsantrasyonlarda ise larvalar üzerinde herhangi bir etkinin olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, Thiram'ın uygulama konsantrasyonları 0,0005 gr/L, 0,001 gr/L ve 0,002 gr/L olarak belirlenirken; Methoxyfenozid için ise 0,1 ml/L, 0,2 ml/L ve 0,4 ml/L olarak tespit edildi. Sonraki aşamada transheterozigot 3. evre larvaları elde etmek amacıyla; 40 adet multiple wing hairs (mwh/mwh) erkek birey ve 40 adet flare (flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>) virjin dişileri çaprazlandırıldı. 72±4 saatlik larvalar pestisitlerin belirlenen konsantrasyonları uygulanarak hazırlanan *Drosophila* İstant Medium hazır besiyerde beslendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak ise MMS ( 10 ppm ) kullanıldı. Konsantrasyon ve kontrol gruplarına maruz bırakılan hazır besiyer ortamında gelişen ergin bireylerin kanatlarından preparatlar hazırlanarak oluşan mutasyonlar tespit edildi.

*Drosophila melanogaster* stok kültürlerinin devamlılığı ve flr<sup>3</sup>/mwh bireylerinin çaprazlaması aşamasında standart besiyer kullanılırken pestisit uygulama basamaklarında *Drosophila* instant medium hazır besiyer kullanıldı.



Çalışma 25 °C sıcaklık ve ortalama %60 bağıl nemde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda yapılmıştır. Sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilebilmesi için deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. SMART yönteminin basamakları

### 3.5.1. Flr<sup>3</sup> virjin dişi bireyler ile mwh/mwh Erkek Bireylerinin aprazlanması

SMART yönteminde  $72 \pm 4$  saatlik transheterozigot larvalar elde edebilmek amacıyla flr<sup>3</sup> virjin dişi bireyler ile mwh erkek bireylerinin standart besiyere yumurta bırakmaları sağlandı. Bu işlem aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi.

Flare (flr<sup>3</sup>) ırkına ait kültür stoklarından pupaların çok bulunduğu, yaklaşık 10 günlük standart besiyer şişelerinden sinekler uzaklaştırılarak sadece pupaların kalması sağlandı.

*Drosophila* dişi ergin bireyleri pupadan çıktıktan 4-6 saat sonra eşeyssel olgunluğa erişmektedir. Bu sebeple standart besiyer şişelerinden çıkan ergin bireyler 3,5 saatlik aralıklarla toplandı. Toplanan bireyler boş bir besiyer şişesine aktarıldı ve bayılmaları için şişenin ağzı yaklaşık bir dakika boyunca eterle ıslatılmış pamuk yardımıyla kapatıldı.

Eterle bayıltilan flr<sup>3</sup> ergin bireyler petri kabına aktarılarak stereo mikroskop altında virjin dişi bireyler erkek bireylerden ayrıldı. 40 adet flr<sup>3</sup> virjin dişi birey elde edilene kadar bu işleme devam edildi. Toplanan flr<sup>3</sup> virjin bireyler çaprazlama şişesine aktarılanaya kadar boş bir besiyer şişesinde bekletildi.

Mwh ırkına ait erkek bireyler ise 3-5 gün önceden sineklerin uzaklaştırıldığı standart besiyer ortamındaki pupalardan gelişen ergin bireylerden seçildi. Eterle bayıltilan ergin bireyler boş bir petri kabına alındı ve stereo mikroskop altında erkek bireyler dişilerden ayrıldı. 40 adet mwh erkek ergin birey elde edilene kadar bu işleme devam edildi. Toplanan mwh erkek ergin bireyler standart besiyer ile hazırlanan çaprazlama şişesine aktarılanaya kadar boş bir besiyer şişesinde bekletildi.

40 adet flr<sup>3</sup> virjin birey ile 40 adet mwh/mwh erkek birey bir gün önce hazırlanmış olan standart besiyer ortamına aktarıldı. Besiyer şişesinin ağzı sünger ya da pamuk ile kapatılarak üzerine birey sayısı, aktarım tarihi ve saati not edildi (şekil 3.4).



Şekil 3.4. Standart besiyer ile hazırlanan flr<sup>3</sup>/mwh çaprazlama şişeleri

### 3.5.2. Transheterozigot larvaların elde edilmesi

40 adet flr<sup>3</sup> virgin dişi birey ile 40 adet mwh/mwh erkek birey döllenme ve embriyogenezin gerçekleşmesi için standart besiyer ile hazırlanan çaprazlama şişesinde laboratuvar koşullarında 2 gün süreyle bekletildi. Süre sonunda ergin bireyler yeni besiyer şişelerine aktarıldı.

Yeni besiyere aktarılan ergin bireyler yumurta bırakmaları için 8 saat burada bekletildi. Yumurta toplama aşamasından sonra erginler besiyer ortamından uzaklaştırılarak başka taze besiyer ortamına alındı ve flr<sup>3</sup>/mwh çaprazlarının devamlılığı sağlandı.

72±4 saat sonra besiyere bırakılan yumurtlar 3. larva evresine geldi ve 72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr<sup>3</sup> transheterozigot larvalar elde edildi.

### 3.5.3. Transheterozigot larvaların pestisit uygulanan hazır besiyere aktarımı

Flr<sup>3</sup> virgin dişi bireyler ve mwh erkek bireylerin çaprazlanmasından 8'er saatlik periyotlarla toplanan yumurtalardan elde edilen 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalar thiramın: 0,0005 gr/L, 0,001 gr/L, 0,002 gr/L ve methoxyfenozidin: 0,1 mL/L, 0,2 mL/L ve 0,4 mL/L konsantrasyonları ile hazırlanan instant medium hazır besiyere aktarıldı. Negatif kontrol için instant medium hazır besiyer distile su ile hazırlandı. Pozitif kontrol

için ise hazır besiyere MMS (10 ppm) ile muamele edildi. Uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Şekil 3.5).

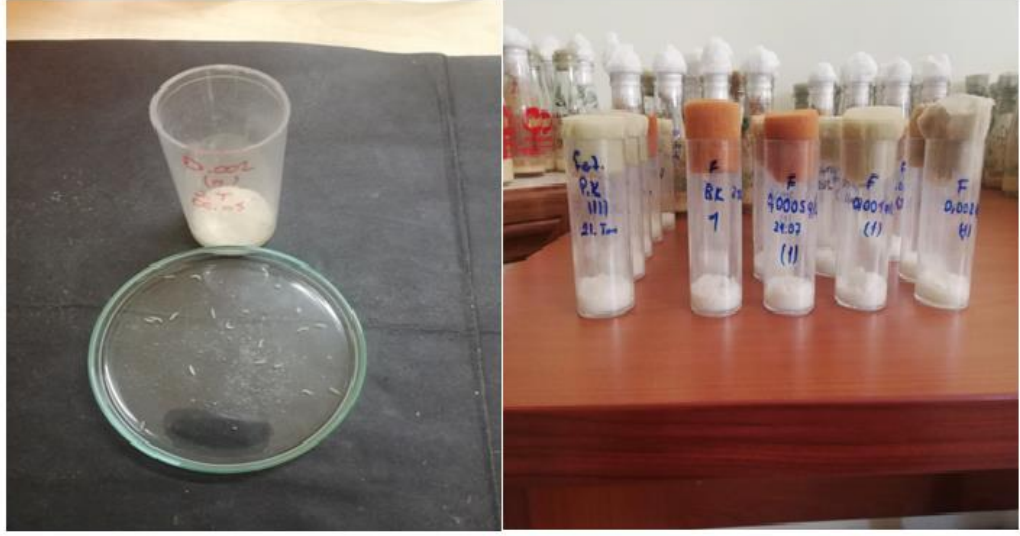
Plastik kaplar içerisine 1,5 gr *Drosophila* instant medium hazır besiyer eklendi ve üzerlerine madde adı, uygulanan konsantrasyon, uygulama tarihi ve saati yazıldı.

Kaplardaki hazır besiyer, pestisitlerin konsantrasyonları ve kontrol gruplarının 5 mL'si ile muamele edildi. Konsantrasyon grupları ve kontrol grupları uygulanan instant medium hazır besiyerin iyice kuruması için bir süre beklendi.

72 ± 4 saatlik transheterozigot larvaların bulunduğu çaprazlama şişeleri musluk suyu altına tutularak dikkatlice çalkalandı. Çalkalanan şişeler petri kaplarına akıtılarak larvaların buraya geçmesi sağlandı.

Petri kaplarındaki 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalar bir spatül yardımı ile instant medium hazır besiyere yaklaşık 60 adet olacak şekilde aktarıldı. Plastik kapların ağızları sünger ile kapatıldı (Şekil 3.5).

Pestisit konsantrasyonları, MMS ve disitile su ile muamele edilen instant medium hazır besiyer ortamında beslenerek gelişen ve hayatta kalarak ergin bireylere dönüşen sinekler normal kanat ve serrat kanat olmak üzere ayrıldı. Bu bireyler %70 alkol içeren tüpler içerisine aktarılarak preparasyon işlemine kadar 4 °C ye ayarlı buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3.5.  $72 \pm 4$  saatlik transheterozigot larvaların pestisit konsantrasyonları ile muamele edilen hazır besiyerlerin bulunduğu plastik kaplara aktarımı

#### 3.5.4. Thiram ve Methoxyfenozid için kanat preparatlarının hazırlanması aşaması

%70 alkol çözeltisi, içerisindeki ergin bireylerle birlikte küçük bir süzgecin içerisine aktarılmak suretiyle sineklerden uzaklaştırıldı. Süzgeç içerisindeki erginler distile su ile yıkandı ve bir süre kurumaları beklendi. Kuruyan erginler işlem için petri kabına aktarıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Alkol çözeltisinin uzaklaştırılması ve sineklerin kurutulması

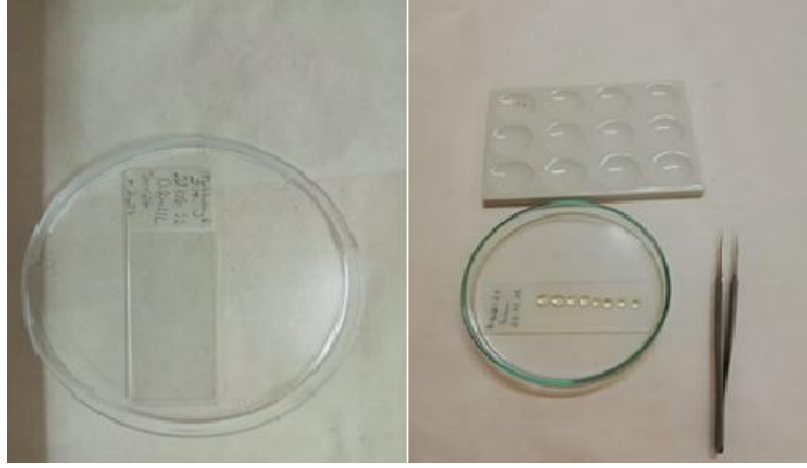
Petri kabı içerisinde dorsal konuma getirilen ergin bireyin thorax bölgesine ince uçlu penset ile baskı uygulandı. Bu baskı ile her iki tarafa doğru açılan kanatlar, kanat bütünlüğüne zarar verilmeyecek şekilde bir bisturi yardımı ile stereo mikroskop altında gövdeden ayrıldı. Her bir ergin için bu işleme devam edilerek 40 çift toplamda 80 adet kanat elde edildi. Kanat çiftlerinden biri zarar gördüğünde diğer kanatta kullanılmadı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Stereomikroskop altında diseksiyon işlemi

Gövdeden ayrılma esnasında kanatta kalan ekstra vücut doku parçaları bir bisturi ile kesilerek uzaklaştırıldı. Kanatların monte edileceği bir lam üzerine tarih, uygulanan kimyasal, uygulama konsantrasyonu, kanat yapısı (normal kanat/serrat kanat), kaçınıcı tekrar olduğu yazılarak hazırlandı (Şekil 3.8).

Hazırlanan lam petri kabına alındı ve üzerine 1 damla Faure solüsyon eklendi. Bir çift kanat stereo mikroskop altında bu faure solüsyon içine bırakılarak monte edildi. Bu işlem diğer kanat çiftleri içinde tek tek uygulanarak yatay olarak 8 çift dikey olarak 3 sıra olacak şekilde 24 çift toplam 48 kanat yan yana dizildi.



Şekil 3.8. Uygulama grubu ve tarihi yazılan lam üzerine yerleştirilen kanat çiftleri

Kanat çiftlerinin bulunduğu lamların üzeri bir başka petri kabı ile kapatılarak 2 gün boyunca kurumaya bırakıldı. Kuruyan kanatların bulunduğu lamın yatay boşluklarına, kanatlara değmeyecek şekilde tek bir çizgi şeklinde Faure solüsyon damlatıldı (Şekil 3.9).

Faure solüsyon eklenen lam üzerine 24×60 mm'lik lamel 45 °C'lik bir açıyla rodajlı kısma denk gelmeyecek ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Bu işlem sırasında yanlardan taşan faure solüsyon distile su ile hafifçe ıslatılmış bir bez yardımı ile silindi. Preparatın tozlanması önlemek ve yanlardaki nemliliği gidermek amacıyla kurutma kâğıdına sarıldı. Preparatların üzerine ağırlık konularak faure solüsyon içerisindeki kanatların tam olarak açılması için 2 gün bekletildi (Şekil 3.9).

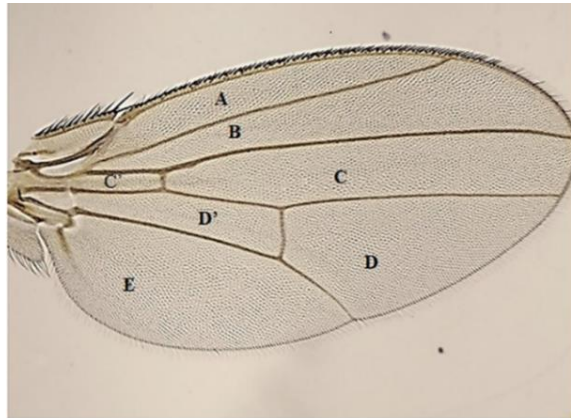
Süre sonunda ağırlık preparatın üstünden kaldırıldı ve kurutma kâğıdı açıldı. Ağırlık nedeniyle taşan solüsyonlar ve kurutma kâğıdından kalan parçalar ksilen ya da distile su ile nemlendirilmiş olan bir bezle silinerek preparat kutularına yerleştirildi. Kutularda bulunan örnekler mutant klonların analiz edileceği döneme kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.9. Lam üzerine yerleştirilen kanat çiftlerinin daimî preparat haline getirilme aşamaları

### 3.5.5. Mutant klonların tespit edilmesi

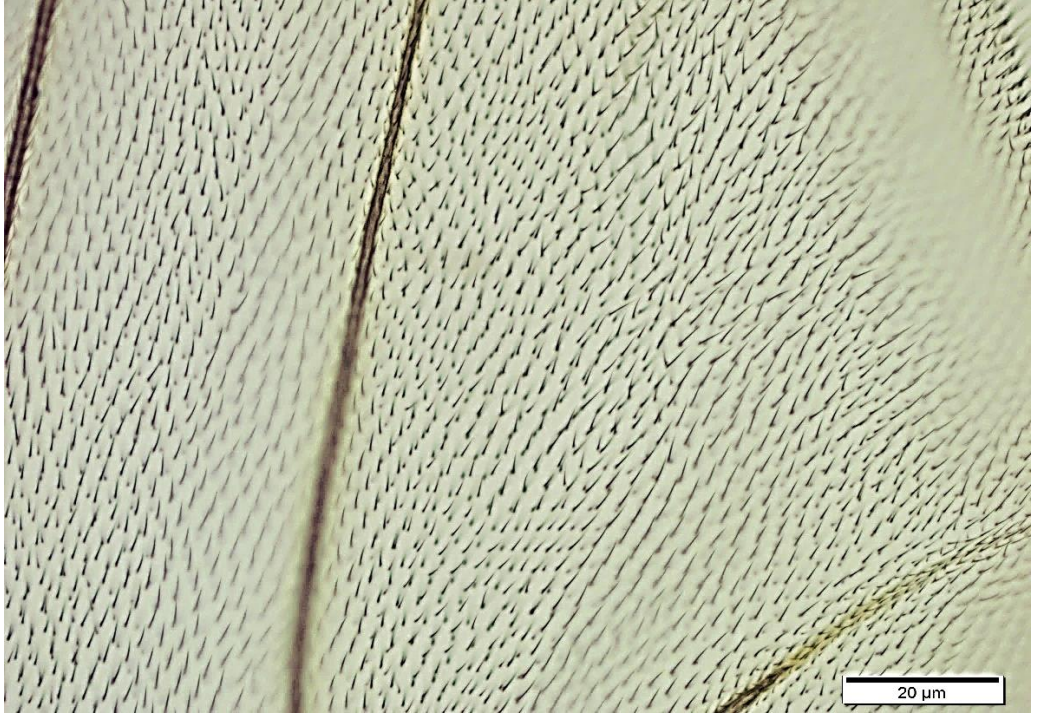
Hazırlanan preparatlardan mutant klonların tespit edilmesi ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. Kanatlar A, B, C, C', D, D', E olacak şekilde sektörlere ayrıldı (Şekil 3.10) ve hem dorsal hem de ventral olacak şekilde 10x40 büyütmede incelenerek tespit edilen mutant klonlar görüldüğü sektöre kaydedildi.



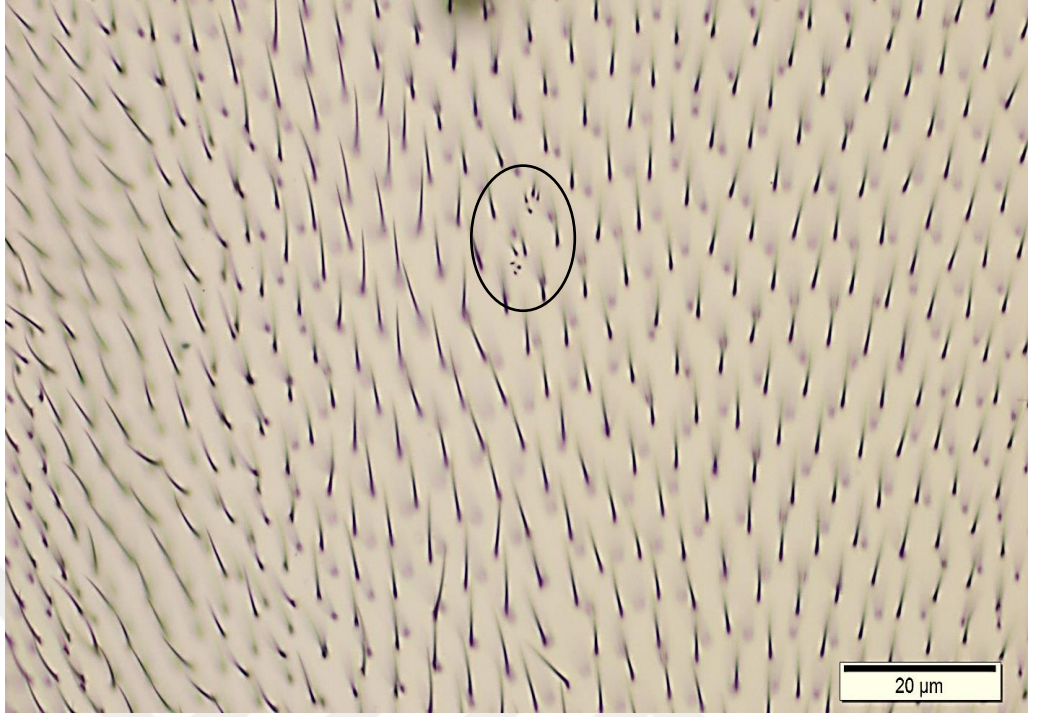
Şekil 3.10. Sektörlerin kanat üzerinde gösterimi



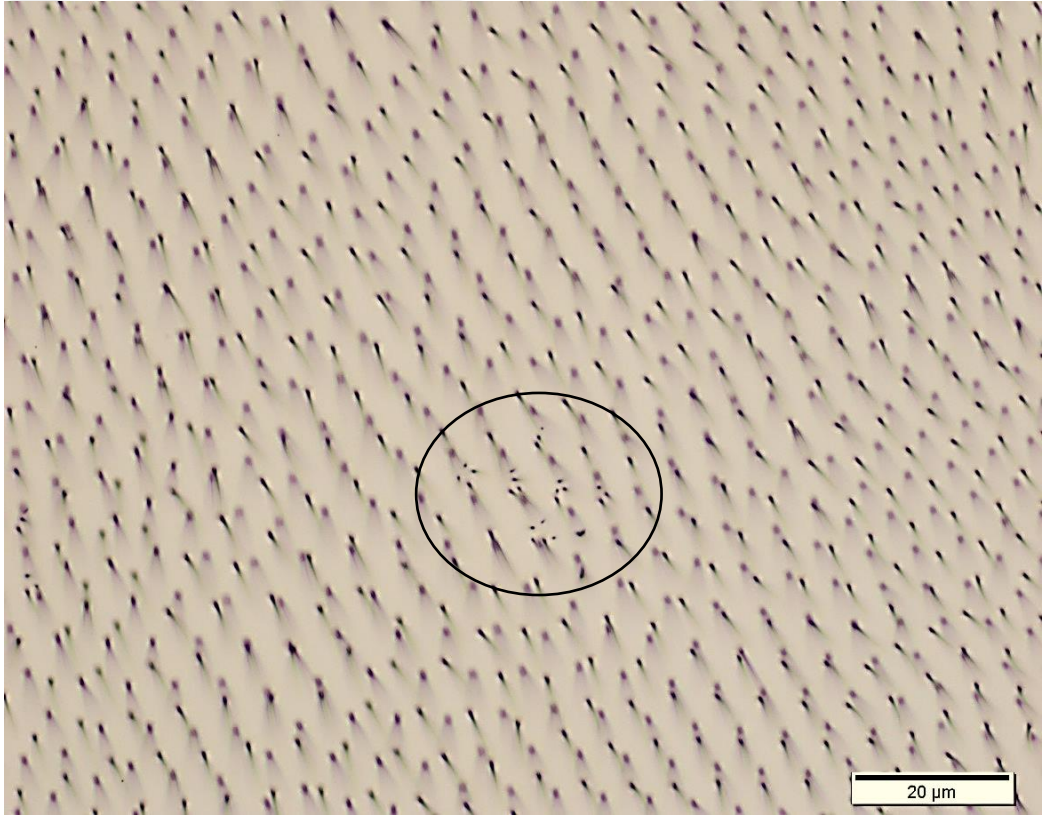
Mutant klonlar, Graf ve çalışma arkadaşlarına göre değerlendirilmiştir. Çalışmada mutant klonlar istatistiksel analiz için tek tip klonlar ve ikiz klonlar olacak şekilde sınıflandırıldı. Tek tip klonlar, mwh hüresine ait 1 ya da 2 mutant trikom içeren küçük tek tip klonlar (Şekil 3.12); mwh hüresine ait 3 ya da 3ten fazla trikom içeren ve 4 ya da fazla sayıda flr<sup>3</sup> içeren trikomlar büyük tek tip klonlar olmak üzere iki grupta incelendi (Şekil 3.13). Bir arada bulunan mwh ve flr<sup>3</sup> klonlar ikiz olarak kaydedildi (Şekil 3.14). Ancak bu iki klon arasında 3 ya da daha fazla sayıda yabancı tipte trikom (Şekil 3.11) görülürse ayrı klonlar olarak değerlendirildi [132].



Şekil 3.11. Yabancı tipte kanat kılları

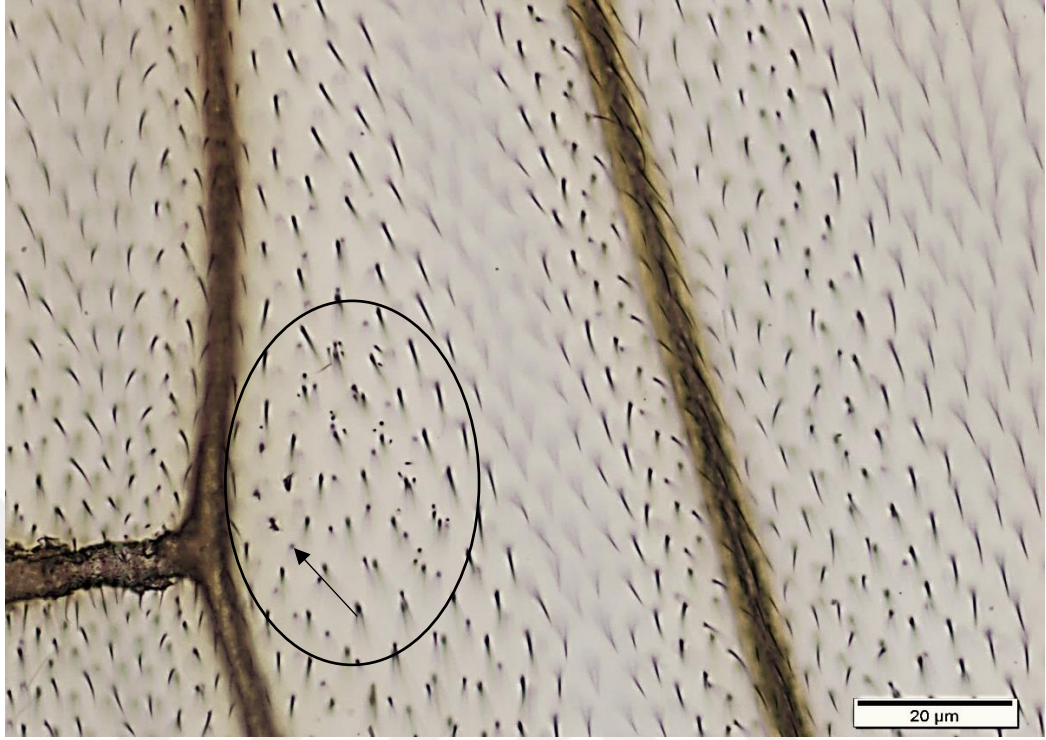


Şekil 3.12 Küçük tek tip mwh klon

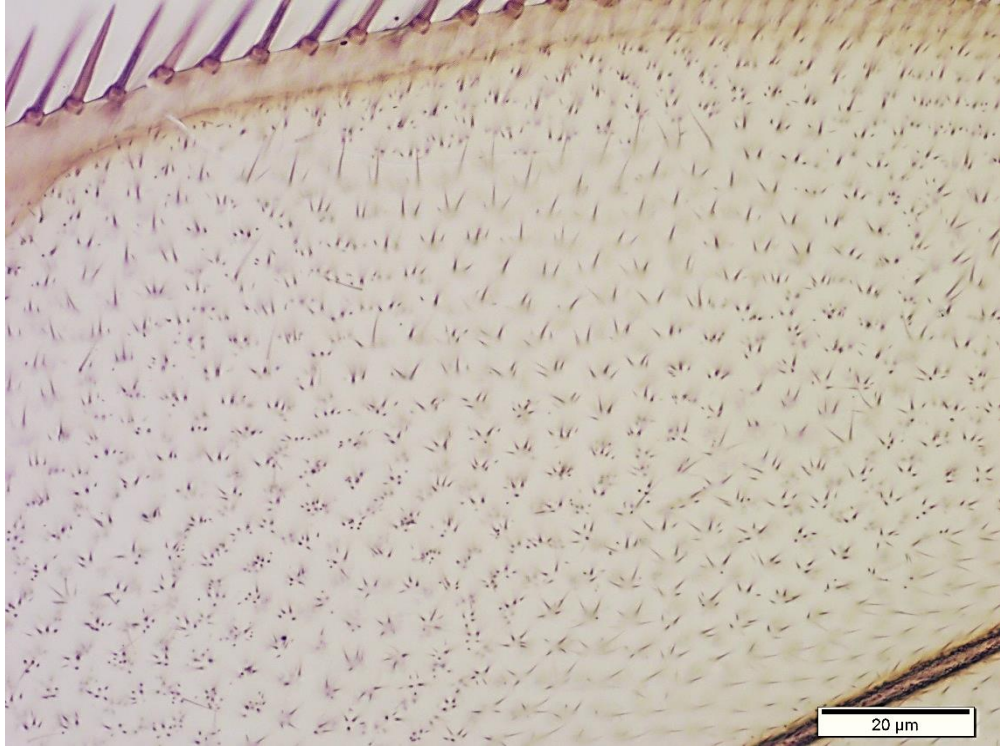


Şekil 3.13. Büyük tek tip mwh klon

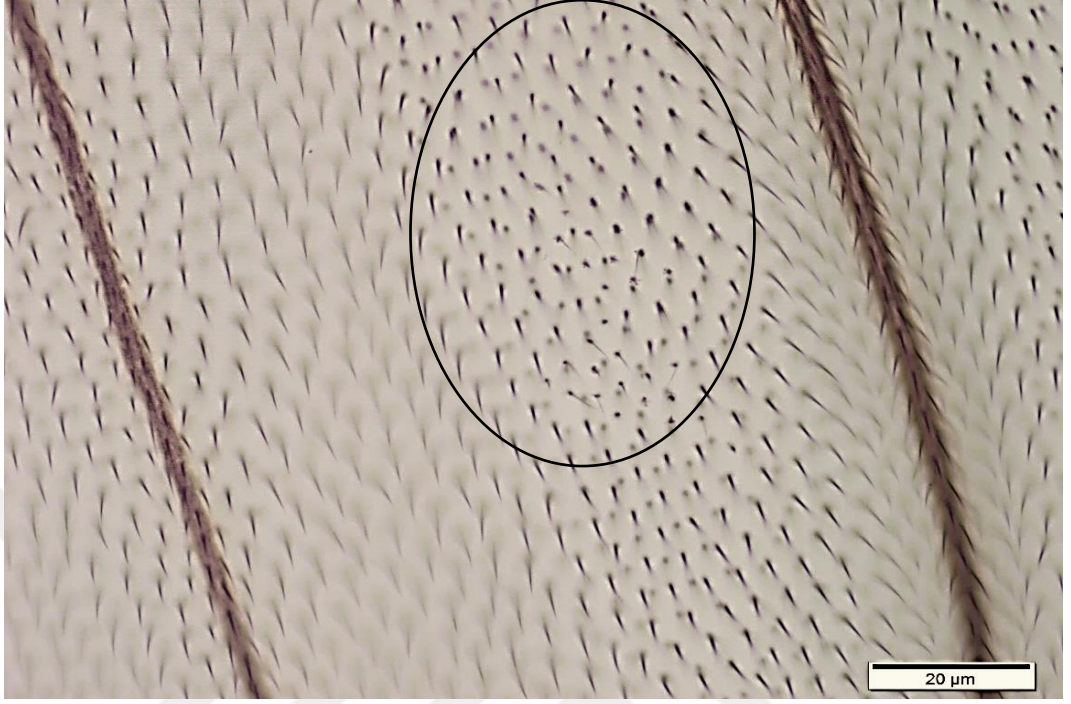




Şekil 3.14. Mwh ve flare hücrelerinin oluşturduğu ikiz klonlar



Şekil 3.15. mwh/mwh klonlar



Şekil 3.16. flr<sup>3</sup> klonlar

### 3.5.6. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Mutant klonların ortalama indüksiyon frekanslarının hesaplamasında aşağıda belirtilen formül kullanılmaktadır. Mwh klonları temel alınarak hazırlanan bu formülde: mwh klonlarının ortalama indüksiyon frekansı  $f$  ile gösterilmektedir. Çalışmada tespit edilen toplam mwh klon sayısı  $n$ , mwh klonların tespiti için analiz edilen kanat sayısı  $N$  ve bu kanatlarda incelenen 24.400 hücre ise  $C$  harfi ile gösterilmektedir [142].

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

Erken dönem larvalarda oluşan mutant klonlar az sayıda olmasına rağmen büyük klonlardır. Larva dönemi boyunca hücrelerin mitozla sürekli çoğalması, imajinal disk hücrelerinin de sayısının artmasına sebebiyet vermektedir. Böylece kimyasala maruz bırakılan larvanın yaşının artması ile klon indüksiyon frekansının artması beklenir. Genç larvaların aksine yaşlı larvalarda klon sayısı arttıkça klon küçülmektedir. Buna göre kanat

somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için 72 saatlik larvaların bir kimyasalın genotoksisitesinin değerlendirilmesinde daha uygun olduğu bildirilmektedir.

### 3.5.7. Sonuçların analizi

*Drosophila* SMART yöntemi kapsamında hazırlanan preparatların sayılması sonucu elde edilen klon sayı verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Kastenbaum ve Bowman binominal koşullu test yöntemi ve  $\chi^2$  testleri kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel işlemlerde Mathematica 11 programı kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi ise 0,05 olarak belirlenmiştir. Uygulanan kimyasalın oluşturduğu frekans değerleri değerlendirilirken negatif (-), pozitif (+), zayıf pozitif (w) ve ihmal edilebilir farklılık (i) değerlendirmeleri Frei ve Würger çoklu karar metoduna göre yapılmıştır (Tablo3.1) [143].

Tablo 3.1. SMART yönteminde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan hipotez tablosu

Hipotezler	H <sub>A</sub>	
	Kabul (1- $\beta$ )	Ret ( $\beta$ )
H <sub>0</sub>	Önemsiz Fark	Negatif
Kabul (1- $\alpha$ )	$P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	$P=(1-\alpha)\beta= \beta-\alpha\beta$
	Pozitif	Zayıf Pozitif
Ret ( $\alpha$ )	$P= \alpha(1-\beta)= \alpha- \alpha\beta$	$P= \alpha\beta$

Uygulama grubunda (nt) elde edilen mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit ya da büyük ise orijinal hipotez (H<sub>0</sub>) reddedildi. Kontrol grubunda (nc), benzer şekilde mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse alternatif hipotez (H<sub>A</sub>) reddedildi. Hipotezlerin kabul ya da reddedilmesinde [144] çizelgesi kullanıldı.

**Nc:** İncelenen kanatların kontrol grubundaki sayısını ifade etmektedir.

**Nt:** İncelenen kanatların uygulama grubundaki sayısını ifade etmektedir.

**nc:** Kontrol grubunda tespit edilen mutant klonların sayısını ifade etmektedir

**nt:** Uygulama grubunda tespit edilen mutant klonların sayısını ifade etmektedir.

**n:** Toplam mutant klonların sayısını ifade eder ve aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\mathbf{n=nt+nc}$$

**H<sub>0</sub>** hipotezi için:

**P<sub>0</sub>:** Kontrol grubu için beklenen mutant klon frekansı değerini ifade etmektedir.

$$\mathbf{P_0= Nc/(Nc+Nt)}$$

**q<sub>0</sub>:** Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı değerini ifade etmektedir.

$$\mathbf{q_0= Nt/(Nc+Nt)}$$

**H<sub>A</sub>** hipotezi için:

**P<sub>A</sub>:** Kontrol grubu için beklenen mutant klon frekansı değerini ifade etmektedir.

$$\mathbf{P_A=Nc/(Nc+mNt)}$$

**q<sub>A</sub>:** Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı değerini ifade etmektedir.

$$\mathbf{q_A= Nt/ (mNc+mNt)}$$

## 4. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1. Allium Test Yönteminde Elde Edilen Sonuçlar

##### 4.1.1. Thiramın soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanması sonucu tespit edilen genotoksik etkiler

Thiramın 0,25 gr/L, 0,5 gr/L ve 1 gr/L konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan *A. cepa* meristematik kök hücrelerinde oluşan genotoksik etkiler mitotik indeks (Mİ), faz indeksi ve kromozom anomali parametrelerine bakılarak değerlendirilmiştir. İstatiksel farklar distile su kullanılan negatif kontrol grubu ve uygulama grubunda belirlenen değerler karşılaştırılarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de gösterilmiştir. Thiramın *A. cepa* hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri ise şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Thiramın soğan kök hücrelerinde bölünme hızını etkileyerek mitotik indeksi düşürdüğü görülmüştür. Mitotik indeks değerlerinin negatif kontrole göre konsantrasyon arttıkça azaldığı belirlenmiştir. Negatif kontrolde mitotik indeks değeri  $6,94 \pm 0,43$  iken en düşük konsantrasyon değeri 0,25 gr/L ise mitotik indeks  $5,50 \pm 0,28$  olarak belirlenmiştir. Mitotik indeksin bu konsantrasyon da kontrol değeri ile kıyaslandığında hücre bölünmesinde yaklaşık %20 oranında bir azalma olduğu görülmüştür. 0,5 gr/L konsantrasyonunda mitotik indeks  $4,45 \pm 0,26$  olarak kaydedilmiş olup bu konsantrasyonda mitotik indekste yaklaşık %36 azalmanın meydana geldiği ortaya konmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 1 gr/L' de mitotik indeks değerinin  $3,72 \pm 0,35$  olduğu ve hücre bölünme hızının yaklaşık %46 oranında azaldığı belirlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda meydana gelen mitotik indekste azalma miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Thiramın *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekanslarına etkileri

	<b>Dozlar (gr/L)</b>	<b>Mitotik İndeks (%) ±SS</b>	<b>Profaz (%) ±SS</b>	<b>Metafaz (%)±SS</b>	<b>Anafaz (%)±SS</b>	<b>Telofaz (%)±SS</b>
<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Negatif Kontrol</b>	6,94 <sup>a</sup> ±0,43	4,25 ±0,82	44,88 ± 0,80	31,99± 2,69	18,90±2,82
	<b>Pozitif Kontrol</b>	3,71 <sup>a,b</sup> ±0,21	4,30 ±0,29	48,51±0 ,05	34,91±3,86	12,26±3,62
<b>Deney Grubu</b>	<b>0,25 gr/L</b>	5,50 <sup>a,b,c</sup> ±0,28	4,14 ±0,73	48,60 ±1,68	33,14±2,04	14,10±3,24
	<b>0,5 gr/L</b>	4,45 <sup>a,c</sup> ±0,26	2,64 ±1,45	46,87 ±2,65	33,38±5,06	17,10±4,12
	<b>1 gr/L</b>	3,72 <sup>a,c</sup> ±0,35	3,68 ±1,30	49,13 ±1,78	31,62±3,60	15,55±2,24

İstatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı fark içeren değerler aynı harflerle gösterilmiştir  
Mİ: Mitotik İndeks, ±SS: ± Standart Sapma

Faz indeksi verileri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde profaz evresinde gözlenen hücre sayısında bir azalma olduğu, deney gruplarında ise metafaz-anafaz aralığında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile deney grupları arasında faz indeksi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.1) ( $p \geq 0,05$ ).

Thiramın soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanmasının genotoksik etkileri incelenmiştir. Genotoksisite indeksi, negatif kontrol grubunda  $11,13 \pm 1,03$  iken, deney grubunda konsantrasyon artışıyla birlikte artış göstermiş olup 0,25 gr/L, 0,5 gr/L ve 1 gr/L konsantrasyonlarında sırasıyla  $14,33 \pm 2,08$ ,  $15,27 \pm 0,83$  ve  $17,07 \pm 0,42$  şeklindedir. Doz grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.2).

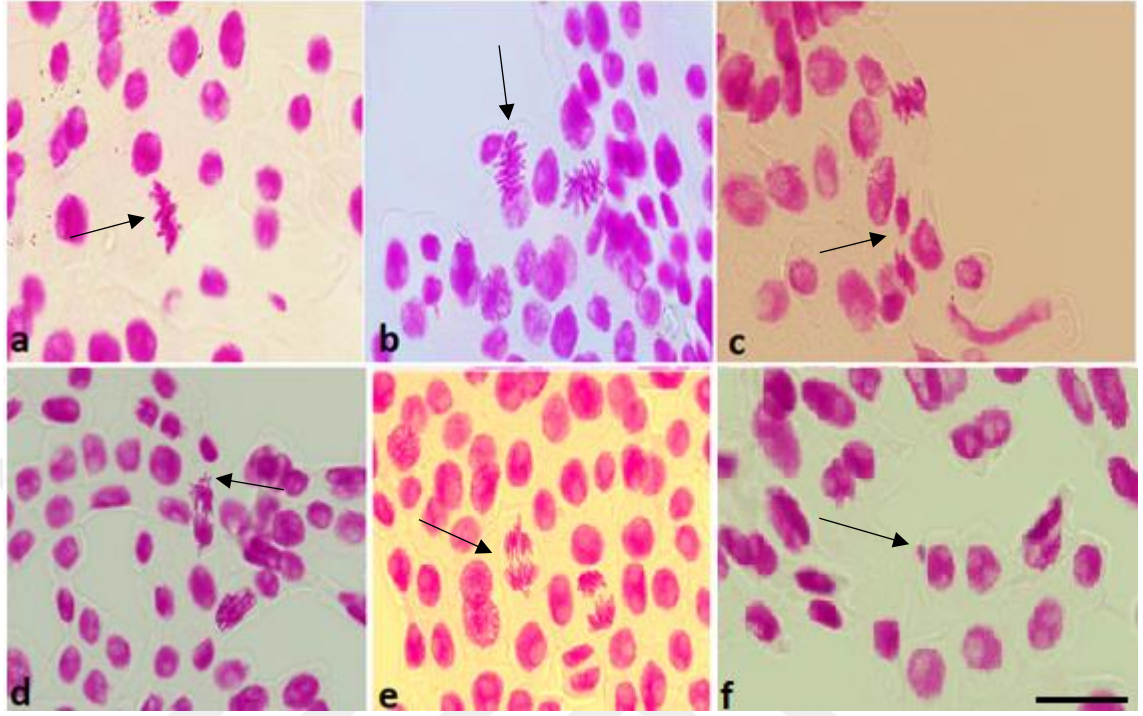


Thiramın metafaz evresinde en fazla düzensizlik oluşumunu uyardığı kaydedilmiş, aynı zamanda yapışıklık ve fragment oluşumlarının da uyarıldığı belirlenmiştir. Anafaz-telofaz evrelerinde ise köprü oluşumları, ileri gitme, geri kalma, yapışıklık ve kutupsal kayma gibi anomali tiplerinin sıklıkla gözlemlendiği kaydedilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Thiramın genotoksik etkileri

Anormalliler (Ortalama $\pm$ SS)	Kontrol grubu		Deney grubu		
	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	0,25 gr/L	0,5 gr/L	1 gr/L
Mikronukleus	0,47 $\pm$ 0,12	1,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,53 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,31
Düzensiz Metafaz	3,8 $\pm$ 0,2	5,07 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,87	4,47 $\pm$ 0,99	4,73 $\pm$ 0,42
Metafazda Yapışıklık Sayısı	1,27 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 0,31	1,73 $\pm$ 0,64	1,87 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 0,12
Düzensiz Anafaz Sayısı	0,2 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,31	0,8 $\pm$ 0,4	0,67 $\pm$ 0,31	0,73 $\pm$ 0,12
Anafazda Yapışıklık Sayısı	0,2 $\pm$ 0,2	0,67 $\pm$ 0,31	0,47 $\pm$ 0,12	0,53 $\pm$ 0,31	0,47 $\pm$ 0,31
Fragment Sayısı	0,2 $\pm$ 0,2	0,53 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,2	0,07 $\pm$ 0,12	0,27 $\pm$ 0,12
İleri Gitmiş Kromozom Sayısı	0,2 $\pm$ 0,2	0,73 $\pm$ 0,23	0,13 $\pm$ 0,23	0,47 $\pm$ 0,31	0,27 $\pm$ 0,12
Geri Kalmış Kromozom Sayısı	1,73 $\pm$ 0,42	2 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,4	2,07 $\pm$ 0,23
Kutup Kayması Sayısı	1,8 $\pm$ 0,2	4,67 $\pm$ 0,64	2,47 $\pm$ 0,64	2,87 $\pm$ 0,31	3,13 $\pm$ 0,31
Anafazda Köprü Oluşumu	1 $\pm$ 0,4	1,53 $\pm$ 0,12	1,33 $\pm$ 0,42	1,47 $\pm$ 0,23	1,8 $\pm$ 0,2
c-Mitoz Sayısı	0 $\pm$ 0	0,27 $\pm$ 0,12	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Multipolarite	0,27 $\pm$ 0,31	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	0,53 $\pm$ 0,5	0,73 $\pm$ 0,12
Genotoksosite indeksi(%)	11,13 <sup>a</sup> $\pm$ 1,03	20,27 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,23	14,33 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2,08	15,27 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,83	17,07 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,42

İstatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı fark içeren değerler aynı harflerle gösterilmiştir,  $\pm$ SS:  $\pm$  Standart Sapma



Şekil 4.1. Thiramın *A. cepa* hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri: a. metafazda yapışıklık, b. ring kromozom, c. anafazda yapışıklık, d. vagrant, e. anafaz köprüsü, f. mikronükleus (Skala=10 µm)

#### 4.1.2. Methoxyfenozidin soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanması sonucu tespit edilen genotoksik etkiler

Methoxyfenozid'in 0,005 mL/L, 0,01 mL/L ve 0,02 mL/L konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan *A. cepa* meristematik kök hücrelerinde oluşan genotoksik etkiler mitotik indeks (Mİ), faz indeksi ve kromozom anomali parametrelerine bakılarak değerlendirilmiştir. İstatiksel farklar distile su kullanılan negatif kontrol grubu ve uygulama grubunda belirlenen değerler karşılaştırılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4' de gösterilmiştir. Methoxyfenozidin *A. cepa* hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Methoxyfenozid'in soğan kök hücrelerinde bölünme hızını etkileyerek mitotik indeksi inhibe ettiği görülmüştür. Mitotik indeks değerlerinin negatif kontrole göre konsantrasyon arttıkça azaldığı belirlenmiştir. Negatif kontrolde mitotik indeks değeri

7.28±0,32 olarak tespit edilmiş iken düşük konsantrasyon değeri 0,005 mL/L ise mitotik indeks 5,58 ±0,40 olarak belirlenmiştir. Mitotik indeksin bu konsantrasyon da kontrol değeri ile kıyaslandığında hücre bölünmesinde yaklaşık %19 oranında bir azaldığı görülmüştür. 0,01 mL/L konsantrasyonunda mitotik indeks değeri 4,71 ± 0,44 olarak kaydedilmiş olup bu konsantrasyonda mitotik indekste yaklaşık % 35 azalmanın meydana geldiği ortaya konmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 0.02 mL/L de mitotik indeks değerinin 3,97 ± 0,47 ve hücre bölünme hızının yaklaşık %45 oranında azaldığı kaydedilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda meydana gelen mitotik indeksteki azalma miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. 24 saatlik methoxyfenozid uygulamasının *A.cepa* kök hücrelerinde Mitotik İndeks ve Mitotik faz üzerindeki etkileri

	Konsantrasyon (mL/L)	Mitotik İndeks (%) ±SS	Profaz (%)±SS	Metafaz (%)±SS	Anafaz (%)±SS	Telofaz (%)±SS
<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Negatif Kontrol</b>	7,28 <sup>a</sup> ±0,32	7,20±2,35	40,51±2,71	32,81±3,71	19,47±4,16
	<b>Pozitif Kontrol</b>	3,61 <sup>a,b</sup> ±0,38	1,52±0,96	45,92±2,43	29,30±2,37	23,27±0,90
<b>Deney Grubu</b>	<b>0,005 mL/L</b>	5,88 <sup>a,b,c</sup> ±0,40	8,75±6,50	43,71±0,21	29,86±7,76	17,67±1,45
	<b>0,01 mL/L</b>	4,71 <sup>a,b,c</sup> ±0,44	6,85±5,62	43,64±1,17	32,56±8,49	17,19±4,05
	<b>0,02 mL/L</b>	3,97 <sup>a,c</sup> ±0,47	5,20±2,05	46,35±3,11	31,25±4,44	18,91±5,24

İstatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı fark içeren değerler aynı harflerle gösterilmiştir Mİ: Mitotik İndeks, ±SS: ± Standart Sapma

Faz indeksi verileri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde profaz evresinde gözlenen hücre sayısında bir azalma olduğu, deney gruplarında ise metafaz-anafaz aralığında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile deney grupları arasında faz indeksi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.3) ( $p \geq 0,05$ ).

Methoxyfenozidin soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanmasının genotoksik etkileri incelenmiştir. Genotoksisite indeksi, negatif kontrol grubunda %18,07 ± 1,33 iken, deney grubunda konsantrasyon artışıyla birlikte artış göstermiş olup 0,005 mL/L, 0,01 mL/L ve

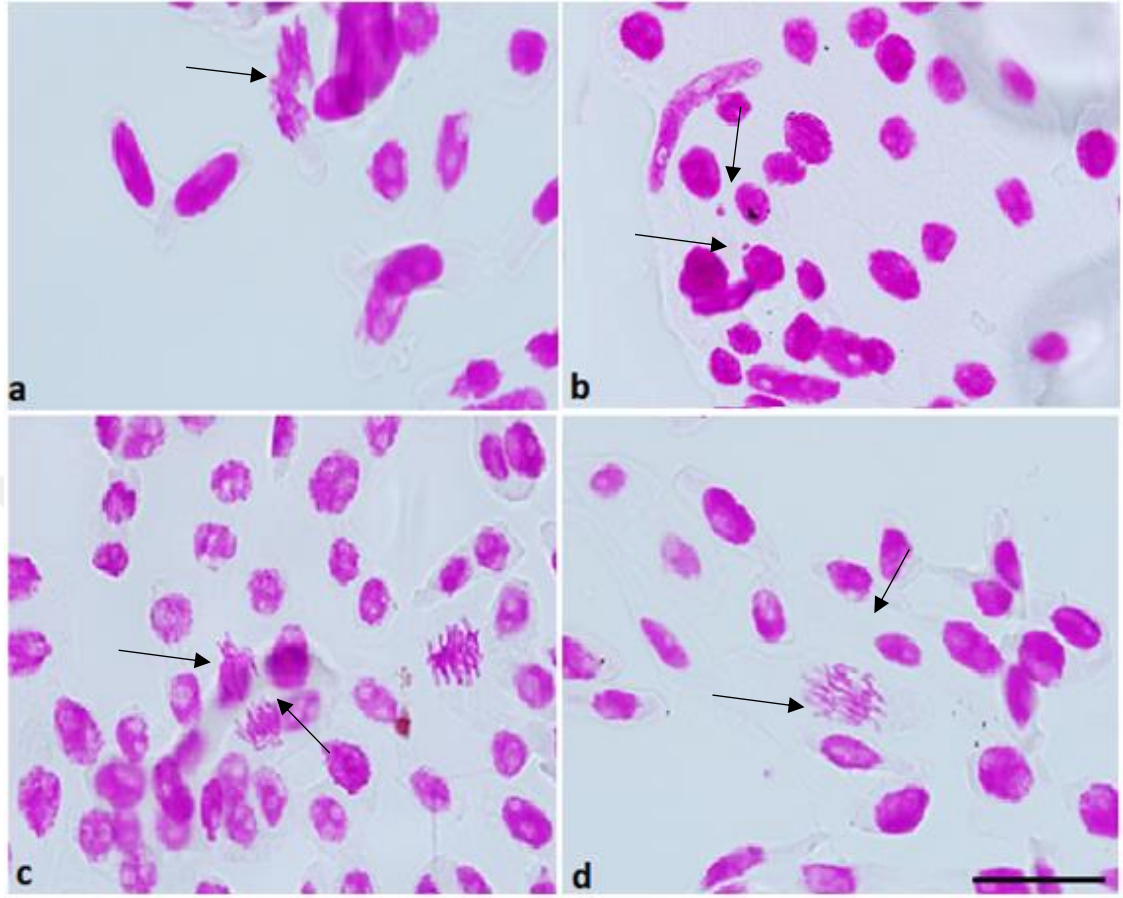
0,02 mL/L konsantrasyonlarında sırasıyla  $25,47 \pm 1,17$ ,  $27,00 \pm 2,00$  ve  $31,13 \pm 0,95$  şeklindedir. Doz grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Methoxyfenozidin genotoksik etkileri

Anormalliler (Ortalama $\pm$ SS)	Kontrol grubu		Deney grubu		
	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	0,005 mL/L	0,01 mL/L	0,02 mL/L
Mikronükleus	0,13 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,31	0,4 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,35	0,67 $\pm$ 0,12
Düzensiz Metafaz	3,13 $\pm$ 0,31	6,47 $\pm$ 0,50	4,53 $\pm$ 0,31	5,07 $\pm$ 0,31	5,40 $\pm$ 0,53
Metafazda Yapışıklık Sayısı	2,40 $\pm$ 0,40	2,67 $\pm$ 0,31	3,53 $\pm$ 0,64	3,93 $\pm$ 0,50	4,00 $\pm$ 0,35
Düzensiz Anafaz Sayısı	0,20 $\pm$ 0,20	0,33 $\pm$ 0,12	0,40 $\pm$ 0,53	1,47 $\pm$ 0,61	1,40 $\pm$ 0,53
Anafazda Yapışıklık Sayısı	0,40 $\pm$ 0,20	0,80 $\pm$ 0,40	1,13 $\pm$ 0,31	1,20 $\pm$ 0,53	1,40 $\pm$ 0,35
Fragment Sayısı	0,13 $\pm$ 0,23	0,40 $\pm$ 0,20	0,07 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,81	1,53 $\pm$ 0,31
İleri Gitmiş Kromozom Sayısı	0,20 $\pm$ 0,20	0,33 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,12
Geri Kalmış Kromozom Sayısı	3,53 $\pm$ 0,61	4,20 $\pm$ 0,20	5,47 $\pm$ 1,42	3,73 $\pm$ 0,42	4,67 $\pm$ 0,70
Kutup Kayması Sayısı	3,27 $\pm$ 0,50	4,47 $\pm$ 0,42	3,80 $\pm$ 0,53	4,33 $\pm$ 0,61	5,13 $\pm$ 0,31
Anafazda Köprü Oluşumu	4,27 $\pm$ 0,70	7,47 $\pm$ 0,50	4,80 $\pm$ 0,53	4,60 $\pm$ 0,80	5,20 $\pm$ 0,53
c-Mitoz Sayısı	0,07 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,20	0,60 $\pm$ 0,20	0,20 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,31
Multipolarite	0,33 $\pm$ 0,23	0,27 $\pm$ 0,12	0,67 $\pm$ 0,42	0,93 $\pm$ 0,92	1,20 $\pm$ 0,20
Genotoksite indeksi(%)	18,07 <sup>a</sup> $\pm$ 1,33	28,47 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,81	25,47 <sup>a,c</sup> $\pm$ 1,17	27,00 <sup>a,d</sup> $\pm$ 2,00	31,13 <sup>a,b,c,d</sup> $\pm$ 0,95

İstatistiksel olarak  $p \leq 0,05$  düzeyinde anlamlı fark içeren değerler aynı harflerle gösterilmiştir,  $\pm$ SS:  $\pm$  Standart Sapma

Methoxyfenozidin metafaz evresinde en fazla düzensizlik oluşumunu uyardığı kaydedilmiş, aynı zamanda yapışıklık ve fragment oluşumlarının da uyarıldığı belirlenmiştir. Anafaz-telofaz evrelerinde ise köprü oluşumları, ileri gitme, geri kalma, yapışıklık ve kutupsal kayma gibi anomali tiplerinin sıklıkla gözlemlendiği kaydedilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Methoxyfenozidin *A. cepa* hücrelerinde oluşumunu teşvik ettiği bazı anomali örnekleri: a. metafazda yapışiklik, b.mikronükleus, c.anafazda vagrant, d. Anafaz köprüsü (Skala=10 µm)

## 4.2. SMART Yönteminde Elde Edilen Sonuçlar

### 4.2.1. Thirama maruz bırakılan 72±4 saatlik mwh/flr<sup>3</sup> TM3, Bd<sup>S</sup> transheterozigot ergin bireylerin kanatlarının incelenmesi ile elde edilen sonuçlar

Thiramın 0,0001 gr 50 mL distile suda çözülerek uygulama konsantrasyonları (0,0005 gr/L, 0,001 gr/L, 0,002 gr/L) hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak ise Metil Metan Sülfonat (MMS) (10 ppm) kullanılmıştır. Konsantrasyon ve kontrol gruplarının 5 ml'si uygulanarak hazırlanan Instant hazır besiyer ortamına bırakılan 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalardan gelişen ergin bireylerden normal ve serrat kanatlı olmak üzere ayrı preparatlar hazırlanmıştır. Kanat preparatlarının

incelenmesi sonucu tespit edilen mutant klonların sayısı Tablo 4.5 ve Tablo 4.6' da verilmiştir.

Transheterozigot  $mwh/flr^3$  (düz kanat kenarlı) bireylerin thiramın uygulama konsantrasyonlarındaki klon indüksiyon frekanslarının 0,97 ile 1,43 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Klon indüksiyon frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla uygulama konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu ve uygulanan konsantrasyon arttıkça klon indüksiyon frekansının arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Thiramın 0,0005 gr/L'lik konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster*  $mwh/flr^3$  transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 15 adet küçük tek tip klon ve 4 adet büyük tek tip klon belirlenmiş olup ikiz klonlara rastlanmamıştır. Bu verilerin, negatif kontrol deneylerinde elde edilen verilerle karşılaştırılması sonucunda, küçük tek tip klonlar, ikiz klonlar ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu gösterilmiştir. Büyük tek tip klonlardaki artış ise negatif olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.5).

Thiramın 0,001 gr/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster*  $mwh/flr^3$  transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 17 adet küçük tek tip klon ve 5 adet büyük tek tip klon ve 1 adet ikiz klon kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar, küçük tek tip klonlar, ikiz klonlar ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermiştir. Büyük tek tip klonlardaki artış ise negatif olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.5).

Thiramın en yüksek konsantrasyonu olan 0,002 gr/L'de  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster*  $mwh/flr^3$  transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 22 adet küçük tek tip klon, 6 adet büyük tek tip klon ve 1 adette ikiz klon sayılmıştır. Buna göre küçük tek tip klonlar ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak pozitif olduğu görülmüştür. Büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Thiram uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/flr3 (Normal kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları

	N	Küçük Tek Tip			Büyük Tek Tip			İkiz Klonlar			Toplam mwh			Toplam Klonlar			f
		Klonlar (1-2)			Klonlar >2			(m=5)			(m=2)			(m=2)			
		Hücre (m=2)			(m=5)												
No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D			
Distile Su	80	10	(0,12)	4	(0,05)	0	(0,00)	14	(0,17)	14	(0,17)	0,72					
MMS (10ppm)	80	31	(0,39) +	14	(0,17) +	1	(0,01) i	45	(0,56) +	46	(0,57) +	2,31					
0,0005gr/L	80	15	(0,19) i	4	(0,05) -	0	(0,00) i	19	(0,24) i	19	(0,24) i	0,97					
0,001gr/L	80	17	(0,21) i	5	(0,06) -	1	(0,01) i	22	(0,28) i	23	(0,29) i	1,13					
0,002gr/L	80	22	(0,28) +	6	(0,07) i	1	(0,01) i	28	(0,35) +	29	(0,36) +	1,43					

N: Kanat Sayısı, Fr: frekans, D: istatistik sonuçlarının gösterimi, +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz fark; m=çarpım faktörü; f: Klon İndüksiyon Frekansı ( $10^5$ ), Olasılık düzeyi:  $\alpha=\beta=0,05$

Thiram uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ TM3 Bd<sup>s</sup> (serrat kanat kenarına sahip) bireylerde klon indüksiyon frekansının uygulama konsantrasyonlarında 0,46 ile 0,87 arasında değiştiği belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla uygulama konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu ve uygulanan konsantrasyon arttıkça klon indüksiyon frekansının arttığı tespit edilmiştir. Toplam mwh klon sayısı negatif kontrol grubunda 10 iken uygulama konsantrasyonlarında 9-17 arasında değişmektedir. TM3 Bd<sup>s</sup> dengeleyici kromozomunun varlığında rekombinasyon baskılandığı için ikiz klonlar serrat kanatlı bireylerde görülmemiştir (Tablo 4.6).

Thiramın 0,0005 gr/L'lik konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/TM3 Bd<sup>s</sup> transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 9 adet küçük tek tip klon sayılırken büyük tek tip klon görülmemiştir. Bu veriler, küçük tek tip klonlar, büyük tek tip klonlar ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermiştir. (Tablo 4.6)

Thiramın 0,001 gr/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/ TM3 Bd<sup>s</sup> transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 12 adet küçük tek tip klon, 3 adet büyük tek tip klon sayılmış olup negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemsiz fark olarak kabul edilmiştir (Tablo 4.6).

0,002 gr/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/ TM3 Bds transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 15 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon sayılmış olup bu artışın negatif kontrol verilerine kıyasla önemsiz olduğu kaydedilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Thiram uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/TM3 Bds (Serrat Kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları

Gruplar	N	Küçük Tek Tip Klonlar (1-2) Hücre (m=2)			Büyük Tek Tip Klonlar >2 (m=5)			Toplam mwh (m=2)			Toplam Klonlar (m=2)			f
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile Su	80	9	(0,11)	1	(0,01)		10	(0,12)		10	(0,12)		0,52	
MMS (10ppm)	80	23	(0,29) +	6	(0,07) i		29	(0,36) +		29	(0,36) +		1,48	
0,0005gr/L	80	9	(0,11) i	0	(0,00) i		9	(0,11) i		9	(0,11) i		0,46	
0,001gr/L	80	12	(0,15) i	3	(0,04) i		15	(0,19) i		15	(0,19) i		0,77	
0,002gr/L	80	15	(0,21) i	2	(0,025) i		17	(0,21) i		17	(0,21) i		0,87	

N: Kanat Sayısı, Fr: frekans, D: istatistik sonuçlarının gösterimi, +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz fark; m=çarpım faktörü; f: Klon İndüksiyon Frekansı ( $10^5$ ), Olasılık düzeyi:  $\alpha=\beta=0,05$

#### 4.2.2 Methoxyfenozide maruz bırakılan $72 \pm 4$ saatlik mwh/flr<sup>3</sup> TM3, Bd<sup>s</sup> transheterozigot ergin bireylerin kanatlarının incelenmesi ile elde edilen sonuçlar

Methoxyfenozidin 0,24 mL/L'si 60 ml distile suda çözülerek uygulama konsantrasyonları (0,1 mL/L, 0,2 mL/L, 0,4 mL/L) hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su,



pozitif kontrol grubu olarak ise Metil Metan Sülfonat (MMS) (10 ppm) kullanılmıştır. Konsantrasyon ve kontrol gruplarının 5 mL'si uygulanarak hazırlanan Instant hazır besiyer ortamına bırakılan  $72 \pm 4$  saatlik transheterozigot larvalardan gelişen ergin bireylerden normal ve serrat kanatlı olmak üzere ayrı preparatlar hazırlanmıştır. Kanat preparatlarının incelenmesi sonucu tespit edilen mutant klonların sayısı Tablo 4.7 ve Tablo 4.8' de verilmiştir.

Transheterozigot *mwh/flr<sup>3</sup>* (düz kanat kenarlı) bireylerin methoxyfenozidin uygulama konsantrasyonlarındaki klon indüksiyon frekanslarının 0,61 ila 0,92 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Klon indüksiyon frekanslarının Negatif kontrol grubuna kıyasla uygulama konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu ve uygulanan konsantrasyon arttıkça klon indüksiyon frekansının arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Methoxyfenozidin 0,1 mL/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster mwh/flr3* transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 10 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon ve 3 adet ikiz klon kaydedilmiştir. Bu verilere göre, tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7).

0,2 mL/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster mwh/flr3* transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 12 adet küçük tek tip, 2 adet büyük tek tip klon gözlemlenmiş olup ikiz klonlara rastlanmamıştır. Buna göre, tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7).

0,4 mL/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster mwh/flr3* transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda normal kanat fenotipine sahip bireylerde 14 adet küçük tek tip, 4 adet büyük tek tip klon ve 1 adet ikiz klon kaydedilmiştir. Bu veriler, tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğunu göstermiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Methoxyfenozid uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ flr3 (normal kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları

	N	Küçük Tek Tip Klonlar (1-2) Hücre (m=2)			Büyük Tek Tip Klonlar >2 (m=5)			İkiz Klonlar (m=5)			Toplam mwh (m=2)			Toplam Klonlar (m=2)			f
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile Su	80	8	(0,1)		2	(0,03)		0	(0,00)		10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
MMS(10 ppm)	80	25	(0,31)	+	5	(0,63)	i	0	(0,00)	i	30	(0,38)	+	30	(0,38)	+	1,54
0,1 ml/L	80	10	(0,13)	i	2	(0,3)	i	3	(0,38)	i	12	(0,15)	i	15	(0,19)	i	0,61
0,2 ml/L	80	12	(0,15)	i	2	(0,3)	i	0	(0,00)	i	14	(0,18)	i	14	(0,18)	i	0,72
0,4 ml/L	80	14	(0,18)	i	4	(0,05)	i	1	(0,01)	i	18	(0,23)	i	19	(0,24)	i	0,92

N: Kanat Sayısı, Fr: frekans, D: istatistik sonuçlarının gösterimi, +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz fark; m=çarpım faktörü; f: Klon İndüksiyon Frekansı ( $10^5$ ), Olasılık düzeyi:  $\alpha=\beta=0,05$

Methoxyfenozid uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ TM3 Bds (serrat kanat kenarına sahip) bireylerin klon indüksiyon frekansının 0,36 ile 0,67 arasında değiştiği belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekanslarının Negatif kontrol grubuna kıyasla uygulama konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu ve uygulanan konsantrasyon arttıkça klon indüksiyon frekansının arttığı tespit edilmiştir. Toplam mwh klon sayısı negatif kontrol grubunda 8 iken uygulama konsantrasyonlarında 7-13 arasında değişmektedir. TM3 Bds dengeleyici kromozomunun varlığında rekombinasyon baskılandığı için ikiz klonlar serrat kanatlı bireylerde görülmemiştir (Tablo 4.8).

0,1 mL/L konsantrasyonunun 72 ± 4 saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/ mwh/ TM3 Bds transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 7 adet küçük tek tip klon kaydedilmiş olup büyük tek tip klon görülmemiştir. Bu veriler, negatif kontrol deneylerinde elde edilen verilerle karşılaştırılmış tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.8).

0,2 mL/L konsantrasyonunun 72 ± 4 saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/ TM3 Bds transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 9 adet küçük tek tip klon 1 adet büyük tek tip klon tespit edilmiştir. Bu veriler,

negatif kontrol deneylerinde elde edilen verilerle karşılaştırılmış tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.8).

0,4 mL/L konsantrasyonunun  $72 \pm 4$  saat boyunca *Drosophila melanogaster* mwh/ TM3 Bds transheterozigot larvalarına uygulanması sonucunda serrat kanat fenotipine sahip bireylerde 12 adet küçük tek tip klon 1 adet büyük tek tip klon tespit edilmiştir. Veriler, tüm klon tipleri ve toplam klonlardaki artışın istatistiksel olarak önemsiz fark olduğunu göstermiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Methoxyfenozid uygulaması sonucu elde edilen transheterozigot mwh/ TM3 Bds (serrat kanat) bireylerin kanatlarında görülen mutant klonlar ve klon indüksiyon frekansları

	N	Küçük Tek Tip Klonlar (1-2) Hücre (m=2)			Büyük Tek Tip Klonlar >2 (m=5)			Toplam mwh (m=2)			Toplam Klonlar (m=2)			f
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile Su	80	6	(0,08)		2	(0,03)		8	(0,1)		8	(0,1)		0,41
MMS (10 ppm)	80	26	(0,33)	+	4	(0,05)	i	30	(0,38)	+	30	(0,38)	+	1,54
0,1 mL/L	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	-	7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,36
0,2 mL/L	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	10	(0,12)	i	10	(0,12)	i	0,51
0,4 mL/L	80	12	(0,15)	i	1	(0,01)	i	13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,67

N: Kanat Sayısı, Fr: frekans, D: istatistik sonuçlarının gösterimi, +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz fark; m=çarpım faktörü; f: Klon İndüksiyon Frekansı ( $10^5$ ), Olasılık düzeyi:  $\alpha=\beta=0,05$

## 5.BÖLÜM

### SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tarımsal üretimde zararlılarla mücadele, tarihsel olarak ilk çağlardan bu yana önemini korumuştur. Doğal bitki ekstraktları ve mineraller, zararlıların ortadan kaldırılması için kullanılan ilk yöntemlerdir. Günümüzde ise doğal bileşiklerin yerini sentetik bileşikler olan pestisitler almıştır. Pestisitler, tarım arazilerinde mahsul kaybını en aza indirerek artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamada kritik bir rol oynamaktadır. Ancak bu çözümün getirdiği önemli sorunlar da vardır. Pestisitler, hedeflenen zararlılar dışındaki canlılar üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir. Ayrıca uzun süreli kalıntı, toprak ve su kirliliği gibi çevresel etkileri de vardır. Pestisitlerin çevre ve canlılar üzerindeki bu olumsuz etkileri, genotoksisite potansiyellerinin tespit edilmesini zorunlu kılmaktadır.

Toksikolojinin alt bilim dalı olan Genotoksikoloji alanında, pestisitler, gıda katkı maddeleri, insan ve hayvan sağlığında kullanılan ilaçlar ve kozmetik ürünleri gibi birçok maddenin genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesini mümkün kılan test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu değerlendirme sürecinde incelenen maddeler, hatalı DNA onarımı ve replikasyonu veya kromozomda yapısal ve sayısal düzenlemeler yoluyla DNA hasarına sebep olmaktadır. Özellikle kromozom düzeyinde gerçekleşen mutasyonlar doğuştan gelen anomalilere veya kanser gibi hastalıklara yol açmaktadır [145, 146]. Halk sağlığı açısından, genotoksisite testlerinin gerekliliği büyük önem taşımaktadır. In vivo ve in vitro olarak birçok organizmada uygulanan genotoksisite test yöntemleri arasında Mikronükleus, Kardeş Kromatit Testi, Comet testi, Ames testi ve Kromozom Anomali Testi gibi testler bulunmaktadır.

Tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan Fertiramın prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda genotoksik etkiler gösterdiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, bu fungusitin insan lenfosit hücrelerinde MN (mikronükleus) ve comet oluşumunu tetiklediğini [147], DNA hasarına yol açtığını, MI indeksini azalttığını ve kromozom anomalilerinin sıklığını önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir [148]. Ayrıca, erkek

farelerde kalıcı genotoksik hasar oluşturduğu, erkek ve sıçan testis hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği ve DNA'da kırık oluşumunu arttırdığı da doğrulanmıştır [149, 150]. Farklı *Salmonella* suşlarında yapılan bakteriyel geri dönüşüm testleri, thiramın mikrobiyal genomda genotoksik etkilerinin varlığını kanıtlamıştır [151].

Günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda thiramın genotoksisite potansiyeli hakkında önemli kanıtlar sağlanmış olsa da aynı organizmayı ve test sistemini kullanan bazı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Doner vd. tarafından yapılan bir çalışmada thiram uygulamasının Çin hamster kemik iliğinde mikronükleus (MN) oluşumuna neden olmadığı bulunmuştur [152]. Sonraki çalışmalar, fare kemik iliğinde 500 mg/kg ve 1000 mg/kg konsantrasyonlarında, Swiss albino farelerin kemik iliğinde 100 mg/kg, 50 mg/kg ve 25 mg/kg konsantrasyonlarında thiramın MN oluşumunu önemli ölçüde artırdığını ortaya çıkarmıştır [153-155]. Araştırmacılar, thiramın farklı dozlarının erkek farelerin germ hücrelerinde anormal sperm oluşumuna ve kromozomal aberasyonların (CAS) sıklığının artmasına neden olabileceğini belirtmiştir [156, 157]. Aynı bir çalışma, önceki çalışmanın bulgularıyla çelişen şekilde, thiramın (tek doz: 75 mg/kg; tekrarlanan beş günlük doz: 25 mg/kg) erkek farelerin germ hücrelerinde genotoksik kanıtını bulamamıştır [158].

Çalışmamızda thiram ve methoxyfenozidin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için mitotik indeks ve kromozom anomali gibi parametreler kullanılmıştır. Mitotik indeks (Mİ), hücre bölünmesinin sıklığını belirleyen güvenilir parametrelerden biri olarak kabul edilmektedir. Test edilen kimyasalın Mİ değeri, büyüme kontrol grubundaki değerden daha düşük çıktığında, bu kimyasalın organizmanın büyümesi ve gelişmesi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, Mİ değeri negatif kontrol grubundan daha yüksek olduğunda, bu durum hücre bölünmesinde artışa yol açar ve bu da hücrelerde kontrolsüz çoğalma ve hatta tümör oluşumu riskini artırabilmektedir [159]. Pestisitlerin genotoksik etkileri nedeniyle Mİ'nin azaldığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [160-162]. Çalışmamızda, Thiram'ın 0,25 gr/L, 0,5 gr/L ve 1 gr/L konsantrasyonlarında tespit edilen mitotik indeks değerlerinin negatif kontrole kıyasla azaldığı belirlenmiştir. Hücre döngüsünün normal işleyişinin en yüksek konsantrasyon olan 1 gr/L'de diğer

konsantrasyonlara göre daha fazla etkilendiği bu sebeple azalan mitotik indeks değerlerinin artan thiram konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Thiramın Mİ üzerindeki etkileri, daha önce yapılmış olan araştırma bulguları ile uygunluk göstermektedir. Franekić vd. tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, Mİ'nin, 24 saat boyunca arpacık soğanı kök hücrelerine uygulanan thiramın konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla azaldığı belirlenmiştir [151]. İnsan lenf hücrelerinde yapılan Cas analizleri de thiramın artan dozlarına bağlı olarak mitotik indeksin azaldığını göstermiştir [148].

Önceki araştırmalar, Allium yöntemi ile değerlendirilen fungusitlerin, hücrelerin mitoza girmesini engelleyerek doza bağlı bir Mİ inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir. Afugan fungusitinin konsantrasyonları 12, 24 ve 48 saatlik süreyle soğan köklerine uygulanmıştır. Mitotik indeks, kontrol ile karşılaştırıldığında uygulama süreleri ve konsantrasyonlardaki artışa bağlı olarak azalma gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonun (60 ppm) 48 saatlik uygulamada aşırı toksisite gösterdiği rapor edilmiştir [163]. Çelik ve çalışma arkadaşları Dinocap fungusitinin uygulama süreleri ve konsantrasyondaki artışa bağlı olarak Mİ inhibisyonuna sebep olduğunu tespit etmiştir. Tüm uygulama sürelerinde en yüksek dozun (100 ppm) yüksek toksisitesi sebebiyle bölünen hücre gözlemlenmemiştir [164]. Yaygın kullanılan mantar ilaçlarından biri olan Carbendazim'in soğan kök ucu hücrelerinin bölünmesini engelleyerek mitotik indeksi inhibe ettiği farklı çalışmalarla doğrulanmıştır [165, 166].

Mitotik indeks inhibisyonu, DNA hasarı gibi mitodepresif etkilerin hücrenin normal işleyişini bozmasından kaynaklanabilir. Mİ inhibisyonunun bir diğer sebebi ise test edilen fungusitin içerisindeki aktif maddelerin, belirli protein ve enzimlerle negatif bir etkileşim oluşturması sonucu DNA polimerazı etkileyerek DNA sentezinin baskılanmasıdır [167]. Bu etkileşimler, hazırlık evresinden bölünme evresine geçişte önemli olan mikrotübül oluşumu, nükleoprotein sentezi ve yeterli ATP üretimi gibi süreçleri bloke ederek hücrelerin mitoza girmesini engeller ve Mİ inhibisyonuna neden olabilir [168, 169].

Allium test yöntemi ile thiramın genotoksisitesinin değerlendirildiği diğer parametre kromozom anomalileridir (KA). 24 saat thirama maruz bırakılan soğan kök uçlarından

hazırlanan preparatların analizi ile KA oranlarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Sıklıkla görülen aberasyon tipi; düzensizlikler, köprü oluşumu, yapışıklık, vagrant, multipolarite ve kutup kayması olarak kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, Thiram'ın soğan kök hücreleri üzerindeki etkilerinden biri kromozomal düzensizlik olarak tespit edilmiştir. Düzensiz metafaz kaydedilen bir anomali tipidir. İğ ipliği oluşum mekanizmalarında bozulmalar ya da kimyasalların interfaz hücrelerindeki mikrotübül sayısını azaltarak ve metafaz plakasında mikrotübüllerin paralel dizilimini bozarak düzensizliğe neden olduğunu ortaya koymuştur [170, 171]. Profenophos ve Mancozeb pestisitlerinin *Hordeum vulgare L.* (arpa) bitki hücrelerinde en fazla düzensiz metafaz frekansını arttırdığı tespit edilmiştir. [172]. Benzer bir sonuç triazol fungusitlerden Tebuconazole 'de rapor edilmiştir [173].

Araştırmalar, Tirazin sınıfı bazı herbisitler (Atrazine ve Simazine) [174] herbisit flurochloridone [175] ve mantar ilacı Dinocapın [164] metafaz evresindeki KA oranlarının tüm konsantrasyon ve uygulama zamanlarında önemli düzeyde arttırdığını ortaya koymuştur.

Thiram konsantrasyonlarının uyardığı bir diğer KA tipi köprü oluşumdur. Anafaz ve telofaz safhalarında görülen köprüler, eşit olmayan kromatit translokasyonu sırasında kromozom/kromatit kırılması ya da disentrik kromozomların varlığı durumunda meydana gelmektedir [176].

Mikroskobik analizlere göre, thiramın soğan kök hücrelerindeki etkileri incelendiğinde, KA tipi içerisinde vagrant kromozomların varlığı görülmüştür. Vagrant oluşumunun yavru hücrelerde kromozom sayısı bakımından çeşitlilik gösteren farklı büyüklükte ve yapıda çekirdek oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir [177]. Macar ve çalışma arkadaşları tarafından trifloxystrobin fungusitinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonucunda MN ve fragment oluşumundan sonra en fazla vagrant kromozom oluşumunu arttırdığı kaydedilmiştir [178].

Yapışıklık ve kutup kayması da görülen aberasyonlar arasında kaydedilmiştir. Yapışıklığa neden olan hücresel olaylarla ilgili farklı görüşler bulunmaktadır. Mustafa ve Arıkan, DNA'nın dejenerasyonu ve depolimerizasyonu sonucu meydana gelen yığılmaların yapışık hücre oluşumuna sebep olduğunu bildirmiştir [179]. Diğer bir çalışmada ise yapışık hücrelerin, kromozomlar arası kromatin liflerinin yanlış katlanması sonucu kromozomlar arasındaki sub-kromatid bağlantılardan meydana geldiği tespit edilmiştir [180, 181]. Bu aberasyon tiplerine ek olarak; multipolarite, kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozom gruplaşması da kaydedilmiştir. Sonuç olarak thirama maruz kalan soğan kök hücrelerinde hasarlı hücre sayısının kontrole göre uygulama konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Thiramın kromozomal anomali oluşturma potansiyelinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Franekic ve çalışma arkadaşları, arpacık soğanı olarak bilinen *Allium ascalonicum* kök hücrelerinde thiramın kromozomal anomalileri uyardığını tespit etmiştir. Buna ilaveten yapışıklık, kromozomal köprü, poliploid, mikronükleus, multipolarite ve düzensiz anafaz gibi anomali tipleri kaydedilmiştir [151].

Thirama maruz kalan erkek İsviçre albino farelerinin üreme hücrelerindeki davranışları kromozom aberasyon (CAs) ve sperm morfoloji test yöntemleri ile incelenmiştir. (CAs) yönteminde elde edilen bulgular sperm hücrelerinde, uygulanan tüm doz seviyesinde thiramın kromozom anomalilerini önemli düzeyde arttırdığını göstermiştir [156].

Yaygın olarak kullanılan mantar ilaçlarından Captan'ın 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm ve 40 ppm konsantrasyonlarının 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalar sonucu *A. cepa* kök hücreleri üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Çalışmada profazda düzensizlik, metafazda düzensizlik ve yapışıklık, anafazda köprü oluşumu ve yapışık kromozom anomalileri rapor edilmiştir [182]. Bir diğer mantar ilacı olan Raxil'in soğan kök hücrelerinde tüm konsantrasyon ve uygulama sürelerinde anomali oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. Düzensiz metafaz-anafaz, yapışıklık, köprü oluşumu en çok kaydedilen anomali tipleridir [173]. Ayrıca Carbendaizim ve Mancozebin metafaz evresinde düzensizlik, yapışıklık ve C-metafaz; anafaz ve telofaz evrelerinde köprü oluşumu, kayma, multipolarite ve laggard oluşumunu teşvik ettiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [165, 183].



*A. cepa* meristematik kök hücrelerinde Topas 100 fungusitinin 6 saatlik uygulama süresinde bile C-mitoz, köprü, düzensizlik ve C-anafaz anomalilerinin oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir. Fungusit maruziyeti arttıkça anomali miktarının da arttığı görülmüştür [184].

Ditiyokarbamatlı fungusitlerin farklı bitki sistemlerinde MI değerlerinde azalma ve KA'ların artması gibi etkilerine dair birçok araştırma bulunmaktadır. Ditiyokarbamatlı fungusitlerden, Ziram ve Etilen tiyoüre (ETU)'ün soğan kök hücrelerinde, köprü oluşumu, yapışıklık, multipolarite, anafazda düzensizlik gibi anomalilerin oluşumunu tetiklediğini ve artan konsantrasyonlarda mitotik indeksi azalttıkları tespit edilmiştir [151]. Mancozebin, *A. cepa* kök hücrelerinde ve arpa tohumlarında mitotik indeksi azaltarak kromozom anomali yüzdesini arttırdığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [172, 183]. Shanthi ve Krishnamoorthy, ferbamın *A. cepa*'da bölünme safhalarında kromozom kırıklarını arttırarak klastojenik ve mutajenik etkilere sebep olduğunu belirtmişlerdir [185]. Benzer şekilde propinebin ve mitotik indeksi azalttığı ve toplam anomali frekansını önemli ölçüde arttırdığını rapor edilmiştir [186].

Akpınar, ülkemizde çok tüketilen, ticari öneme sahip *Lycopersicon esculentum* (domates) tohumlarında thiramın genotoksitesini Allium test yöntemi ile araştırmıştır. Fungusitin ticari dozlarının kullanıldığı çalışmada domates tohumları bu dozlara 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılmıştır. Mitotik indeksin, thiramın uygulanan doz miktarı arttıkça kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Aberasyon oranlarının thiram dozlarındaki artışa bağlı olarak arttığı kaydedilmiştir. Benzer test yöntemi ile farklı bir materyalin test edildiği araştırmamızda elde edilen sonuçlar, bu çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermektedir [187].

Thiram, cypermethrin ve quizalofop-p-ethyl pestisitlerinin *Glycine max* L (soya fasulyesi) üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmıştır. RAPD-PCR ve protein analizleri ile değerlendirilen pestisitlerin soya fasulyesinde kök büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Kök büyümesindeki inhibisyona paralel olarak mitotik indeksinde inhibe olduğu ve kontrol grubuna göre %50'lik bir azalma gösterdiği saptanmıştır [188].

Methoxyfenozid, insektisitlerin bisasilhidrazin grubunda yer alan yeni nesil büyüme düzenleyici olarak bilinmektedir. Bisasilhidrazin grubundaki insektisitler, böceklerde larval dönemde hücre bölünmesi, dönüşüm ve olgunlaşma gibi süreçlerden sorumlu ekdison hormonunun normal işleyişini etkileyerek büyüme ve gelişim süreçlerini bozarak etkili olmaktadır. Methoxyfenozid, özellikle Lepidoptera larvalarında ekdison etkiler göstererek zararlı kontrolünü sağlamaktadır [137, 189].

Methoxyfenozidin genotoksitesisi hakkında mevcut bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. *Salmonella typhimurium* 'un çeşitli suşlarını kullanan ters mutasyon testlerinden elde edilen sonuçlar negatif çıkmıştır [190-192]. Ayrıca Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde hpvt lokusunda kromozomal hasar veya gen mutasyonları gözlenmemiştir. Fare kemik iliğinde yapılan in vivo mikronukleus testleri, in vitro testlerden elde edilen bulgularla uyumlu olarak negatif sonuçlar vermiştir [193, 194]. Bu verilere bakılarak methoxyfenozidin genotoksitesite potansiyeli konusunda kesin sonuçlara varmak zordur. Bu böcek ilacının potansiyel genotoksik etkilerini tam olarak anlamak ve güvenliğini belirlemek için çeşitli test sistemleri ve organizmalar kullanıldığı daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Methoxyfenozid'in soğan kök ucu hücrelerinde distile su ile karşılaştırıldığında Mİ azalttığı belirlenmiştir. Methoxyfenozidin Mİ üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak insektisitlerin soğan kök hücrelerinde Mİ inhibisyonuna sebep olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Diazinon [195], Lindane [196], Imidacloprid [197], Cypermax plus 550 (Chloropyrifos %50 + Cypermetrin %5 EC) [198] ve Abamectin [178] insektisitlerinin soğan kök hücrelerinde Mi azalmasına neden olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Methoxyfenozid'in soğan kök hücrelerinde en fazla düzensiz metafaz oluşumuna sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç insektisitlerin metafaz hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerinin tespit edildiği önceki çalışmaları doğrulamaktadır. Deltametrin insektisitinin 24 saat soğan kök hücrelerine uygulanmasının metafaz hücrelerinde mikrotübüllerin paralel dizilimini bozarak anomali miktarını arttırdığı belirlenmiştir

[199]. Mitotik iplikler üzerindeki benzer etkiler, sentetik piretroid insektisitlerden cypermethrin ve fenvaleratin soğan kök hücrelerine 6 ve 24 saat uygulanması ile görülmüştür [200].

Methoxyfenozid'in teşvik ettiği diğer anomaliler sırasıyla Anafaz-telofazda köprü oluşumu, yapışıklık, kutup kayması ve multipolarite olarak kaydedilmiştir. Methoxyfenozidin C-mitoz ve laggard kromozom oluşumunu thirama göre daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Methoxyfenozidinin etkisiyle iğ ipliği işlevindeki engellemeler C-mitoz oluşumuna yol açmaktadır. Laggard kromozomlar bölünme sırasında, doğru şekilde kromozom hareketi ve dağılımından sorumlu olan tübülün proteinlerinin işlevlerinin engellenmesi sonucunda oluşabilmektedir.

Allium test yönteminin kullanıldığı birçok çalışma insektisitlerin farklı bitki sistemlerinde anomali oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. İnceer ve çalışma arkadaşları, Günebakan çiçeği (*Helianthus annuus* L.) kök hücrelerinde Cypermaxin genotoksik etkilerini Allium yöntemi ile araştırmıştır. 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalarda insektisitün düzensiz metafaz, yapışıklık, laggard, C mitoz ve köprü oluşumunu tetiklediği tespit edilmiştir. Mİ süre ve doza bağlı olarak kontrole göre sürekli bir azalma göstermiştir [201]. Deltametrin insektisininde 24, 36 ve 48 saatlik uygulamalarda güne bakan çiçeğinde Mİ indeksi tüm uygulama süresi ve konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde azalttığı ve düzensiz profaz, yapışıklık, C-mitoz, laggard ve köprü oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir [202]. Karaismailoğlu, Pyriproxyfen insektisitinin *A.cepa* somatik kromozomları üzerinde düzensiz profaz, kromatid köprüsü, C-mitoz ve laggard oluşumunu arttırdığını göstermiştir. Mİ değeri en yüksek konsantrasyon (2ppm) ve uygulama süresinde (36 saat) kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır [203]. Methoxyfenozidin soğan kök hücrelerine 24 saat uygulanması ile Mİ değerinin konsantrasyondaki artışa bağlı olarak azaldığı KA oranlarının ise arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçların Allium testi ile genotoksisite potansiyeli belirlenen diğer insektisitlerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Mitotik bitki hücrelerinde kromozom anomalilerinin oluşumunda genotoksik maddelerin işleyiş şekline bağlı iki olası mekanizma bulunmaktadır. İlk olasılıkta genotoksik

maddeler iğ ipliği oluşumunu bozarak ya da tübülünlerin kinetekora bağlanmasını önleyerek anöjenik değişimlere sebep olmaktadır. İkinci olasılıkta madde klastojenik etkiler göstererek DNA'da kırılma ve kopmaları arttırmaktadır [204].

Somatik mutasyon ve rekombinasyon test yöntemi (SMART) kimyasalların genotoksisite potansiyellerinin *Drosophila melanogaster* soyları kullanarak incelenmesine olanak sağlamaktadır. SMART yöntemi; kimyasalların gen mutasyonu, kromozomal yeniden düzenleme, kromozom kırılması veya kaybından kaynaklanan heterozigotluk kaybını indüklemeye potansiyellerini değerlendirmek için hızlı ve etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan thiram ve Methoxyfenozid pestisitlerinin genotoksisitesi, kanat benek testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kimyasal maddelerin *Drosophila melanogaster* kanatlarındaki genotoksik etkileri tek tip klonlar ya da ikiz klonlar şeklinde görülmektedir. Tek tip klonlar genellikle mwh fenotipi, nadiren de flr<sup>3</sup> fenotipi olarak ortaya çıkmaktadır. Kanatlarda 1 veya 2 mwh hücresi olan lekeler küçük tek tip klonlar olarak kabul edilirken, 3 veya daha fazla mwh hücresi olan trikomlar büyük tek tip klonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Araştırmacılar, tek tip klonların oluşumunda nokta mutasyonları, delesyonlar, translokasyon tipleri, monozomi gibi mutasyonların yanı sıra belirleyici genler arasında meydana gelen mitotik rekombinasyonların etkili olduğunu belirlemiştir [205]. İkiz klonlar ise mwh ve flr<sup>3</sup> fenotiplerinin bir arada görüldüğü mutant trikomlardır. Tek tip klonlardan farklı olarak, ikiz klon oluşumunun yalnızca mitotik rekombinasyon sonucunda gerçekleştiği tespit edilmiştir [100].

Thiram'ın 0,0005 gr/L, 0,001 gr/L ve 0,002 gr/L konsantrasyonları ile muamele edilen 72 ± 4 larvalardan gelişen mwh/flr<sup>3</sup> (normal kanat) ve mwh/ TM3 Bd<sup>s</sup> (serrat kanat) ergin bireylerin kanat çiftlerinden ayrı ayrı preparatlar hazırlanmıştır. Genotoksisitenin değerlendirilmesinde klon tiplerinin frekansları ve klon indüksiyon frekanslarının negatif kontrole göre sonuçları, klon indüksiyon frekanslarında bir artış olduğunu ortaya koymuştur.

Thiram'ın küçük tek tip mwh klonlarının oluşumunu indüklediği ancak ikiz klon oluşumuna bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bazı anestezi ajanları [206], gıda katkı maddeleri [207], bor [208], kurşun bileşikleri [209], nanopartiküller [210] ve terpenlerle [211] gerçekleştirilen *Drosophila* kanat mutasyon testinde küçük tek tip klonlarda artış görülürken bu maddelerin ikiz klon oluşumunu etkilemediği tespit edilmiştir.

Kurşun ve çalışma arkadaşları, metiram, kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol fungusitlerinin küçük tek tip klon oluşumunu arttırdığını ancak bu artışın anlamsız olduğunu belirlemiştir. Çalışmada SMART yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre bu fungusitlerin genotoksositeye sebep olmadığı tespit edilirken; Comet deneyinde DNA tek iplik kırığına sebep olduğu belirtilmiştir [212].

Literatür araştırmalarında thiramın genotoksik potansiyelinin *Drosophila* ırklarında kanat benek test yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Thiram'ın genotoksik etkilerini göz benek test yöntemi ile araştırmış ve dar bir doz aralığında (0.2 mM, 0.5 mM, mM, 2 mM) pozitif sonuçlar tespit etmiştir [213]. *Drosophila* ile yapılan resesif letal testlerinde thiram mutajen etki göstererek spermler/spermatidler ve spermatid/spermatositler arasında resesif letal etki oluşturduğu belirlenmiştir. Thiram, mancozeb ve peltar (maneb %50 ve Thiophanate-methyl %25) fungusitlerinin *Drosophila*'da ömür uzunlukları ve larvaların hayatta kalma oranlarına etkileri araştırılmıştır. Veriler, thiramın Oregon bireylerinde ortalama ömür uzunluğunu %42 oranında azaltmıştır. Ayrıca thiramın 500 ila 1500 ppm doz aralığında Oregon ve triploit sinek larvalarında hayatta kalma oranını yaklaşık %60 azalttığı saptanmıştır [214].

Dithiokarbamatlı fungusitlerden Maneb, Zineb, ETU ve phthalimide sınıfı fungusitlerden Captan'ın genotoksitesini *Drosophila* kanat benek test yöntemi ile değerlendirmiştir. Captan ve Zineb için standart (ST) ve yüksek biyoaktivasyonlu (YB) çaprazlarında elde edilen sonuçlar negatiftir. Maneb sadece ST çaprazlamada pozitif sonuçlar gösterirken ETU hem ST hem de YB çaprazlamalarında pozitif sonuçlar göstermiştir. Çalışmada Maneb ve ETU fungusitlerinin *Drosophila* kanatlarında zayıf genotoksosite gösterdiği rapor edilmiştir [215].

Cyprodinil ve Fludioxonil fungusitlerinin genotoksitesisi SMART yöntemi ile araştırılmıştır. Cyprodinil'in ST ve YB çaprazlamalarında en yüksek dozlarda 10 (mM) mutajenik etki göstererek klon indüksiyon frekanslarını arttırdığı belirlenmiştir. Fludioxonil' de yüksek dozlarda benzer etkiler göstererek her iki çaprazlamada da klon indüksiyon frekanslarını yükselttiği görülmüştür [216].

Captan ve Captafol fungusitlerinin mutajenik ve rekombinejenik etkileri *Drosophila melanogaster* kanat hücrelerinde çalışıldı. Genotoksisite testleri için, her iki bileşik akut (3 saat) ve kronik (48 saat) besleme yoluyla 3 günlük larvalara uygulanmıştır. Akut besleme deneylerinde, kaptan ve kaptafol yalnızca 10-100 mM maruziyet konsantrasyon aralığında küçük tek tip ve toplam benekler için pozitif sonuçlar vermiştir. Kronik tedavi deneylerinde ise, captan yalnızca 2.5 ve 5 mM konsantrasyonlarında küçük tek ve toplam lekeler için pozitif sonuçlar göstermiştir. Elde edilen bulgulara göre bu pestisitlerin genel mutajenik aktivitesinin çok zayıf olduğu görülmüştür [217].

Methoxyfenozid 0.1 mL/L, 0,2 mL/L ve 0,4 mL/L konsantrasyonları ile muamele edilen  $72\pm 4$  larvalardan gelişen mwh/flr<sup>3</sup> (normal kanat) ve mwh/TM3 Bds (serrat kanat) ergin bireylerin kanat çiftlerinden ayrı ayrı preparatlar hazırlanmıştır. Genotoksitenin değerlendirilmesinde klon tiplerinin frekansları ve klon indüksiyon frekanslarının distile su kullanılan kontrole göre durumları karşılaştırılmıştır. Buna göre Methoxyfenozidin tüm konsantrasyonlarında ve kanat tiplerinde klon indüksiyon frekanslarının kontrole göre belirlenmiştir.

Methoxyfenozid'in genotoksik etkilerinin SMART yöntemi ile araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır ancak *Drosophila melanogaster* hücrelerinde proliferasyon üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Methoxyfenozidin varlığında ekdisteroid reseptörünün (EcR/USP) işlevsiz hale geldiği tespit edilmiştir [189].

Cypermethrin, Cyphenothrin, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinin ve piperonil butoksid (PBO) karışımlarının *Drosophila* kanat hücrelerindeki etkilerini araştırılmıştır.

İnsektisitlerin sadece letal dozları PBO nun farklı oranları ile karıştırılmış (1:0.25, 1:0.5, 1:0.75, 1:1 ve 1:2) ve genotoksik etki göstermedikleri tespit edilmiştir [218].

Aciole ve çalışma arkadaşları, Dillapoil ve Spinozad pestisitlerinin genotoksitesini *Drosophila* somatik hücrelerinde SMART yöntemi ile değerlendirmiştir. Dillapoil 80 µg mL<sup>-1</sup> ve Spinozad 1.6 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında küçük tek tip mwh klonların oluşumu değerlendirildiğinde pozitif sonuçlar vermiştir. Spinozadın sadece rekombinojenik etkiler gösterdiği ve Dillapoil'den 14 kat daha toksik olduğu kaydedilmiştir [219].

Azametifos, Diklorvos, Metil parathion insektisitlerinin mutajenik etkileri SMART yöntemi ile araştırılmıştır. Diklorvosun diğer iki insektisite oranla daha mutajenik olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak üç insektisit için kaydedilen toplam mutasyon ile incelenen toplam kanat arasında da pozitif bir korelasyon olduğu kaydedilmiştir [220].

Pretiroid grubu insektisitlerinden Deltametrin ve organofosfatlı insektistlerden Permetrinin genotoksik etkileri *Drosophila* kanatlarında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Deltametrinin 25 ppm, 50 ppm ve 75 ppm konsantrasyonlarında, larva ve ergin evrelerde Permetrinden daha toksik olduğunu göstermiştir [221].

Altı farklı insektisit (Allethrin, Dieldrin, Endrin, Dimethoate ve Malathion) ve metilendioksifenolik bileşik piperonyl butoxide'in mutajenik etkileri *Drosophila* kanat mutasyon test yöntemi ile incelenmiştir. ST ve YB çaprazlamalarının analizinde bu maddelerin hepsinin negatif sonuçlar verdiği görülmüştür [222].

Böcek ilacı Fipronilin farklı konsantrasyonları (0,3, 0,7, 1,5, 3,0 × 10<sup>-5</sup> mM) ST ve YB çaprazlamalarından elde edilen üçüncü instar larvalara uygulanmıştır. Fipronil, YB'de tüm dozlarda ST' 0,7 × 10<sup>-5</sup> mM harici dozlarda mutajenik olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile, Fipronilin *Drosophila melanogaster*'in somatik hücrelerinde mutajenik, rekombinojenik ve karsinojenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [223].

Nöro-aktif insektisitler sınıfından thiamethoxam (TMX) ve sistemik insektisitlerden Actaranın mutajenik, rekombinojenik ve karsinojenik etkileri *Drosophila* somatik hücrelerinde araştırılmıştır. Üçüncü instar larvalara TMC ve Actara formülasyonları

uygulanmış (2,4; 4,8;  $9,7 \times 10^{-4}$  ve  $1,9 \times 10^{-3}$  mM) ve yüksek biyoaktivasyonlu bireylerin kanatlarında TMX mutajenik etkiler göstermiştir. Epitel tümör belirleme testinde ise her iki pestisitinde kanserojenik etkileri olmadığı tespit edilmiştir [224].

Sonuç olarak çalışmamızda Thiram'ın mitotik indeks değerini azalttığı ve çeşitli anomali tiplerinin oluşumunu indüklediği bulunmuştur. Bu sonuçlar thiramın Allium test yöntemi ile çalışıldığı önceki çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Ayrıca Thiram konsantrasyonlarının klon indüksiyon frekansını arttırdığı ve özellikle küçük tek tip mwh klon oluşumunu indüklediği kaydedilmiştir. Methoxyfenozid'in Allium testinde mitotik indeksi azalttığı ve çeşitli anomali tiplerinin oluşumun indüklediği tespit edilmiştir. SMART yönteminde ise konsantrasyon arttıkça klon indüksiyon frekanslarının arttırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular, önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında methoxyfenozid'in potansiyel genetik hasar oluşturma yeteneğine dair yeni kanıtlar sunmaktadır.

Zararlılarla mücadelede pestisit kullanımı, biyolojik mücadele ve geleneksel ya da organik tarım gibi Entegre Zararlı Yönetimi (EZY) stratejilerine rağmen hala en çok tercih edilen yöntem olarak kabul edilmektedir. Genotoksisite testleri, pestisitlerin genetik materyalde neden olabileceği değişikliklerin ve genetik hasarların tespit edilmesi ve potansiyel risklerin ölçülmesinde büyük önem arz etmektedir. Bu testler, uygun kullanım dozlarının belirlenmesini mümkün kılarken, sürdürülebilir tarım politikaları oluşturulmasında, biyoçeşitlilik ve halk sağlığının korunmasında bilimsel temel sağlamaktadır. Sonuç olarak pestisit kaynaklı çevresel tehditler ve sağlık riskleri pestisitlerin etki potansiyellerinin anlaşılması ve bu şekilde EZY gibi uygulamalara adaptasyonu ile halk sağlığının korunması için genotoksisite testlerinin artması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesinin önemli olduğu görülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. İnternet: United Nations, "Global Issues Population" <https://www.un.org/en/global-issues/population>.
2. Toros S., Maden S. ve Sözeri S., "Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları" *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi* Yayın No:1508, Ankara ,1999.
3. Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human" *Mutation Research*, 251-272, 2003.
4. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya ve R. Perry, "Insecticides in Agriculture and environment: retrospects and prospect", *Springer-Verlag*, s. 271, Berlin 1998.
5. Eldridge B., "Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides", *CA: Vector-Borne Disease Section*, s. 122, Sacramento 2008.
6. Yadav I. C. ve Devi N. L., "Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment" *Environ. Sci. & Engg.*, 6, 140-158, 2017.
7. Drum, C., "Soil Chemistry of Pesticides", *PPG Industries, Inc.*, USA 1980.
8. Bhalli, J., Khan Q., Haq M., Khalid A. & Nasim A., "Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry" *Mutagenesis* 21(2), 143-148, 2006.
9. Alavanja M., Sandler D., McDonnell C., Lynch C., Pennybacker M., S. Zahm S., Mage D., Steen W., Wintersteen W. & Blair A., "Characteristics of pesticide use in a pesticide applicator cohort: The agricultural health study", *Environmental Research*, 80, 172-179, 1997.
10. Kohen, R., Nyska, A., "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for the quantification" *Toxicology Pathology*, 30 (6) 620-650, 2002.
11. The International Agency for Research on Cancer (IARC), "Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans:112" *World Health Organization*, 112, 2015.

12. Miles J. R. W. ve Harris C. R., "Insecticide residues in a stream and a controlled drainage system in agriculture areas of southwestern ontario". *Pesticides monitoring journal.*, 5 (3), 289-294, 1971.
13. Chisholm D. ve Macphee A., "Persistence and effects of some pesticides in soil", *Econ J Ent*, 65, 1010-1013, 1973.
14. Claborn H., Mann H., Ivey M., "Extraction of toxaphene and strobane in the milk of dairy cows" *J Agr Food Chem*, 11, 286-289, 1973.
15. Zúñiga G., Gómez M., "La prueba de micronúcleos" *Revista de divulgacion científica y tecnologica de la universidad veracruzana*, cilt 19, 2006.
16. Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson, G. Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S. Y., Smit L, "Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticide list", *The Lancet*, 360, 1163-1167, 2002.
17. Yáñez, L., Ortiz, D., Calderón, J., Batres, L., Carrizales, L., Mejía, J., "Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries" *Environ Health Perspect*, 110 (6), 901-909, 2002.
18. Ecobichon D., "Pesticide use in developing countries" *Toxicology*, 160, 27–33, 2001.
19. Garcia, F. P., Ascencio, S. C., Oyarzún, J. C. G., Hernandez, A. C., & Alavarado, P. V. "Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks." *J. Res. Environ. Sci. Toxicol* 1.11: 279-2932012.
20. Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş., & Alvur, M. "DNA hasarı analizinde  $\mu$ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması." *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2 (3): 97-103 2004.
21. Akyil, D., Erdoğan, S., Eren, Y., Özkara, A., & Korcan, E. "Potential antimicrobial and antimutagenic activities of *Astragalus flavescens*", *Fresenius Environmental Bulletin*, 22 (7) 868-18732013.
22. Akyil D. ve Konuk M., "Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange and Ames tests", *Environmental Toxicology*, 937-945, 2014.

23. Barile F., "Principles of Toxicology Testing", *CRC Press Taylor & Francis Group, St. John's University*, s. 366 New York 2008.
24. Topçul M. ve Çetin İ., "Mutation Prevention" *Cancer Treatment Strategies, OMICS Group*, 1-13 2015.
25. Johnson M., "Cell Reproduction and Differentiation" *Human Biology Concepts and Current Issues (7th Edn.)*, *Pearson, Pearson Education*, 684 2013.
26. Pierce B., "Genetics: A Conceptual Approach", *W.H. Freeman & Company*, Texas 2010.
27. Sun J. X., Helgason A., Masson, G., Ebenesersdóttir, S. S., Li, H., Mallick, S., Gnerre S., Patterson N., Kong A., Reich D., Stefansson K., "A direct characterization of human mutation based on microsatellites" *Nature Genetics*, 44, 1161–1165, 2012.
28. Oraler, G., "Genetik", *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi*, İstanbul, s.177 1990.
29. Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Mitchel R., "Robbins basic pathology" 8 th edition. Philadelphia: Saunders (Elsevier), 2007.
30. Turnpenny, P., & Ellard, S., "Emery's Elements of Medical Genetics" 13 th Edition, *Elsevier/Churchill Livingstone* Philadelphia, 2009.
31. S. Khandekar, A. Dive & P. Munde, "Chromosomal abnormalities- A review", *Central India Journal of Dental Sciences*, 4(1), 35-40, 2013.
32. Klug W. S., Cummings, M. R. ve Spencer C. A., "Genetik kavramlar", *Palme Yayınevi*, Ankara, 2009.
33. Demir Z., "Nick Translasyon Yöntemi ile İşaretlenmiş Özgün DNA dizilerinin Kompleks Kromozom Anomalilerinin Aydınlatılmasında Kullanılması" *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Yüksek Lisans Tezi.*, p. 106, 2008.
34. Öner C., "Genetik Kavramlar", *Palme Yayıncılık*, 6. Edth Ankara 2003, s. 455-567.
35. Thompson M. R., McInnes M. Willard H., "Genetics in Medicine", 6th ed., *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, s.464 Pennsylvania 2001.

36. Başaran, N., "Tıbbi Genetik", 8. dzenleme, *Nobel Kitap Evi*, Bursa, 165- 170, 2003.
37. Budak ., "Sperm Parametreleri İle Sperm DNA Fragmantasyonu ve Kromozom Anomalilerinin Karşılaştırılması", *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi*, s.166, Kocaeli, 2014.
38. Balıcek, P., Jüttnerová, V., Jarosová, M., Fialová, J., Fiedler, Z., & Kolmanová, J. "Prenatal diagnosis of de novo complex balanced rearrangements in chromosomes 3, 4, and 13." *Cas Lek Cesk*, 140 (4), 122-124, 2001.
39. Shaffer, L. ve Lupski, J. "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans" *Annu Rev Genet*, 34, 297-329, 2000.
40. Ghanbari M. A., "De novo yapısal kromozom anomalilerinde mikrosatellit analizleri ile parental kökenin belirlenmesi", *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Doktora tezi, İstanbul, 2005.
41. Gardner R., & Sutherland, G., "Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling", *Oxford University Press*, s. 596, New York, 2004.
42. Aminetzach, Y. T., Macpherson, J. M., & Petrov, D. A. "Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*", *Science*, 309, 764–767, 2005.
43. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J., "Molecular cell biology".4th ed., *W. H. Freeman*, s. 1143, New York 2000.
44. Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., & Jacobs-Lorena, M. "Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite", *Nature*, 417, 452-455, 2002.
45. Moreira, L., ve Jacobs-Lorena, M., "Transgenic mosquitoes for malaria control: progresses and challenges", *Neotrop Entomol*, 32, 531-535, 2003.
46. Clancy S., "Genetic mutation", *Nat Edu*, 1, 187–194, 2008.
47. Futuyama , D., "Evrım", *Palme Yayıncılık*, s.632, Ankara 2008.
48. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., "Moleküler Biyoloji", *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara 2007.

49. Najafi, M. B. H., ve Pezeshki, P., "Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: a review", *European Scientific Journal*, 4, 628-638, 2013.
50. Debeleş-Bütüner B. ve Kantarcı, G. "Mutasyon, DNA hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kansere İlişkisi" *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara*, 35 (2), 149 - 170, 2006.
51. Aqeilan, R. I., Zanesi, N., & Croce, C. M., "Environmental, genetic, and viral causes of cancer" *The Biology and Treatment of Cancer Understanding Cancer*, *John Wiley & Sons*, Editörler: Pardee A.B, Stein G.S, s. 35-56, New Jersey, 2009.
52. Frank, E. G., Ennis, D. G., Gonzalez, M., Levine, A. S., & Woodgate, R. "Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis", *Proc Natl Acad Sci USA*, cilt 93, 10291-10296, 1996.
53. Kuru, M. & Gözükar, S., "Genetik", *Palme Yayıncılık* No:186, s.368, Ankara, 2001.
54. Özbek. T., "Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/Salmonella Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması", *Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Y. Lisans Tezi*, Erzurum, 2006.
55. Bahçeci Z., "Moleküler Biyoloji", *Göktuğ Basın Yayın Dağıtım ve Pazarlama Amasya*, 2007.
56. Brown, T., "Genomes" 3.edth, *Garland Science Publishing*, s. 736 New York 2007.
57. Öner, C., Sümer S., Öner, R., Ögüş, A. ve Açık, L., "Genetik Kavramlar", *Palme Yayıncılık* No: 506, Ankara 2009.
58. Karadayı, M., "*Origanum vulgare* L. ssp. elde edilen bazı etken maddelerin Ames/Salmonella ve *E. coli* WP2 test sistemleri ile mutajen ve antimutajen özelliklerinin belirlenmesi", *Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Y. Lisans Tezi*, Erzurum, 2010.
59. Corrie, P., "Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects" *Genes Dev*, 20(1), 1-15, 2006.
60. Wiedemann, G. J., Robins, H. I., Gutsche, S., Mentzel, M., Deeken, M., Katschinski, D. M ve Wagner, T. "Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE)

- combined with 41.8 C whole body hyperthermia in patients with refractory sarcoma", *European Journal of Cancer*, 32(5), 888-892, 1996.
61. Jeremy, W. D. ve Park, S. F., "Molecular Genetics of Bacteria", 5th edition, *A John Wiley & Sons, Ltd*, s. New Jersey, 400, 2010.
  62. Shapiro J., "Ionizing Radiation and Public Health" Radiation Protection, *Harvard University Press* (4th Edn.), USA, 450-511 2002.
  63. Buchel, K., "Chemistry of Pesticides", *John Wiley & Sons, Inc*, s.532, New York, 1983.
  64. Costa, L., "Toxic effects of pesticides," Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, Editör: C. Klaassen, *McGraw-Hil*, New York, 883-930 2008.
  65. Sağlam, H., "Melen havzasında pestisit uygulamaları ve pestisitlerin biyolojik bozunma, yüzeysel akış ve sızma yüzdelerinin tahmini", *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Çevre Bilimleri ve Mühendisliği*, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
  66. Ivic, D., "Curative and eradivative effects of fungicides", *Fungicides*, Editör: O. Carisse, *InTech*, Rijeka, 3-22. 2010
  67. Kaya, S., ve Bilgili, A. "Sümüklü böceklere karşı kullanılan ilaçlar", *Veteriner Farmakoloji 4. Baskı, Medisan Yayınevi*, Ankara, 610-1 2007.,
  68. Yılmaz, A., ve Binzet, A., "Genel zararlılar" Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Editör: M. Aydemir, *T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı*, Ankara, 159-200, 2008
  69. Vural, N., "Toksikoloji", *Ankara Üniversitesi Basımevi*, s.659, Ankara, 2005.
  70. Cope, W., Leidy, R., ve Hodgson, E., "Classes of toxicants: use classes" A Textbook of Modern Toxicology, *John Wiley & Sons Inc.*, 49-74 New Jersey 2004.
  71. S. Kaya ve Z. Karaer, "Halk sağlığı yönünden önemli böceklerin kontrolü", *Veteriner Farmakoloji, 4. Baskı*, Medisan Yayınevi, 611-655 Ankara, 2007.
  72. Chitwood, D., "Nematicides", *Encyclopedia of Agrochemicals*, Editör Plimmer, J. R, *John Wiley and Sons*, s.1104-1115, 2003.

73. Fukuto, T., "Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors" *Bulletin of the World Health Organization*, 44 (1-39), 31-42, 1971.
74. Sogorb, M. A., & Vilanova, E., "Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis." *Toxicol. Lett*, 128(1-3), 215-228 2002.
75. Sulbato, L., "Mammalian toxicology of organo-phosphorus pesticides", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43(1994), 271-1189, 1994.
76. Hajjar, N. P., & Hodgson, E., "Flavin adenine dinucleotide—dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals", *Science* 209(4461), 1134–1136, 1980.
77. Delen, N., "Tarımsal Savaşta Kullanılan İlaçların İnsan Sağlığı Açısından Önemleri" *Ege Üniversitesi Ziraat fakültesi Dergisi*, 16 (3) 123–125, 1979.
78. Furnes B. ve Schlenk, D., "Evaluation of Xenobiotic N- and S-Oxidation by Variant Flavin-Containing Monooxygenase 1 (FMO1) Enzymes", *Toxicology Science*, 78 (2), 196–203, 2004.
79. Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K., "Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids", *Pestic. Biochem. Physiol*, 106 (3) 93-100, 2013.
80. Açar, Ö. Ç. "Pestisit Analizleri Eğitim Notu", *T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi*, 2015.
81. FAO/WHO, "Pesticide residues in food evaluations Part II toxicological", Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, *World Health Organization*, Geneva, 2007.
82. Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C., "Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India", *Science of the Total Environment*, 511 123–137, 2015.
83. Sacramento, C., "Department of pesticide regulation “What are the Potential Health Effects of Pesticides?” *Community Guide to Recognizing and Reporting Pesticide Problems*, s. 27–29., 2008.

84. Dawson, A. H., Eddleston, M., Senarathna, L., Mohamed, F., Gawarammana, I., Bowe, S. J., Buckley, N. A. "Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study," *PLoS Medicine*, 7 (10), 1-10, 2010.
85. Lee, S. J., Mehler, L., Beckman, J., Diebolt-Brown, B., Prado, J., Lackovic, M., & Calvert, G. M. "Acute pesticide illnesses associated with off target pesticide drift from agricultural applications: 11 States, 1998-2006," *Environmental Health Perspectives*, 119 (8), 11–62, 2011.
86. Singh B., & Mandal, K. "Environmental impact of pesticides belonging to newer chemistry", *Integrated pest management*, , Scientific Publishers, s. 152-190, Jodhpur 2013.
87. Pesticide Aktions Netzwerk (PAN), "Pesticides and health hazards Facts and figures". Pesticide Action Network, *GLS Gemeinschaftsbank*, Bochum., s.1-16 2012.
88. Mostafalou, S. & Abdollahi, M., "Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases", *Clinical and Experimental Pharmacology*, S5: e002, 2012.
89. Milli Eğitim Bakanlığı (MEB), "Çevre Sağlığı Pestisitler", *Türkiye Cumhuriyeti Milli Eğitim Bakanlığı*, Ankara , s.54 2012.
90. Yaron, B., "General principles of pesticide movement to groundwater", *Agriculture, ecosystems & environment*, 26 (3-4), 275-297, 1989.
91. Larson, S. J. (2019). "Pesticides in surface waters: distribution, trends, and governing factors" (Vol. 3). CRC Press.
92. İnternet: Food and Agriculture Organization (FAO), "Pesticide Use" 2022a <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>
93. İnternet: Food and Agriculture Organization (FAO), "Pesticide indicators", 2022b <https://www.fao.org/faostat/en/#data/EP>.
94. Özercan B., Taşçı R., "Türkiye’de Pestisit Kullanımının İller, Bölgeler ve Pestisit Grupları Açısından İncelenmesi", *Ziraat Mühendisliği*, 375, 75-88, 2022.



95. GKGM, "İl Düzeyinde Bitki Koruma Ürünlerinin Kullanım (Zirai Mücadele Uygulamalarında) Miktarları", Ankara, 2020.
96. Grant, W. "The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens" *Mutat. Res.*, 310, 175–185, 1994.
97. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal F., ve Sancak, C., "Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L.", *Turk Journal Biology/Türk Biyoloji Dergisi*, 33(4), 283-290, 2009.
98. Njoku, K., Akinola, M. ve Tommy I., "Genotoxicity of industrial paint effluent on the root meristem of *Allium cepa*", *IOSR Journal of Environmental Science.*, 9(2) 11-17, 2015.
99. Bianchi, J., Mantovani, M. S., & Marin-Morales, M. A., "Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture", *Journal of Environmental Sciences*, 36,. 102-111, 2015.
100. Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*" *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.1984.
101. Graf, U.ve Singer D., Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila*," *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 15-27, 1992.
102. U. Graf ve F. Würgler, "The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*," *Environmental and molecular mutagenesis*, 27(3), 219-226, 1996.
103. Köksal P. M., *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (Smart) yöntemiyle bazı anestezi ajanlarının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı*, Erzincan 2015.
104. Bahçeci, Z., Genetik 3. Baskı, *Öğrenci Kitabevi Yayınları*, s.8-10 Kırşehir 2010.
105. Bernards A. ve Hariharan, I., "Of flies and men studying human disease in *Drosophila*," *Curr Opin Genet Dev*, 11(3), 274-278, 2001.

106. Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H., "*Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity", *Nanotoxicology*, 9 (3), 396-403.
107. McMillan, I., Fitz-Earle, M., & Robson, D. S. "Quantitative Genetics of Fertility I. Life Time Egg Production of *Drosophila melanogaster*" *Theoretical Genetics*, 65 (2), 349-353, 1970.
108. Ashburner, M., "*Drosophila* a laboratory handbook", *Spring Laboratory Press*, s. 1440, New York, 1989.
109. Bayğu, G., "Cimin üzümü yaprağı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülünün genotoksik etkisinin kanat benek testi ile belirlenmesi", *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı*, Erzincan, 2020.
110. Falakalı, B., "*Drosophila* Genetiği", *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, İzmir s.1-10, 1989
111. Lewis, G., Rubin, E., "A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research", *Science*, 287, 2216-2217, 2000.
112. Graf, U. Singer D., "Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Revistan Internacinol de Contamination Ambiental* 8 (1), 15-27, 1992.
113. Doğan, E. "Bazı astrozon grubu tekstil boyaalarının genotoksik etkisinin *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılması," *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, 2002.
114. Ashburner M., Clark, C., "The Developmental and Genetic Basis of Sexual Dimorphism in *Drosophila*", *BioEssays*, 2(3), 131-139, 1980.
115. Turkuez, H., Arslan M. E., Özdemir, Ö., "Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089-1098, 2017.
116. Russo, A., "In vivo cytogenetics: mammalian germ cells", *Mutat Res*, 455, 167-189, 2000.

117. Hagmar, L. Stromberg U. ve Tinnerberg H., "The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis" *Int J Hyg Environ Health*, 204 (1), 43-47, 2001.
118. Ames, B., Mccann J., ve Yamasaki E., "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity", *Mutat Res*, 31(6), 347-364, 1975.
119. Doak, S., Manshian, B., Jenkins G. ve Singh, N., " In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines", *Mutat Res*, 745(1-2), 104-111, 2012.
120. Speit G., Vazquez M., ve Hartmann, A., "The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity", *Mutat Res*, 681(1), 3-12, 2009.
121. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis" *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 193-201.2011.
122. Fenech M., "The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry", *Health Phys*, 98, 234–243, 2010.
123. Al-Sabti, K., ve Metcalfe, C., "Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water", *Mutat Res Toxicol*, 343 121–135, 1995.
124. Hovhannisya, G., "Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology", *Mol Cytogenet*, 3-17, 2010.
125. Fiskesjö G., "The Allium test as a standard in environmental monitoring", *Hereditas*, 102(1), 99-112, 1985.
126. Rank, J., Nielsen, M. H., "Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater". *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(1), 17-24.1994.
127. Singh R., & Agrawal, M., "Allium test: a valuable tool for evaluation of genotoxicity of environmental pollutants", *Environ Monit Assess*, 78(1), 83-98, 2002.

128. Michalska-Kacymirow, M., Kurek, E., Smolis, A., Wierzbicka, M., & Bulska, E., "Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to selenium inorganic compounds" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3717-3722.2014.
129. Aldaz, S., & Escudero, L. M., "Imaginal discs". *Current Biology*, 20(10), 429-431.2010.
130. Beira J. & Paro, R., "The legacy of *Drosophila* imaginal discs", *Chromosoma*, 125, 573–592, 2016.
131. Pitchakarn, P., Inthachat, W., Karinchai, J., & Temviriyankul, P., "Human hazard assessment using *Drosophila* wing spot test as an alternative in vivo model for genotoxicity testing—A review". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9932.2021.
132. Graf, U., Würzler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P.G., "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*." *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.1984.
133. D. Henderson, "*Drosophila* Cytogenetic Protocols", *Humana Press*, New York 2004.
134. European Food Safety Authority (EFSA), "Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiram"» *EFSA Journal*, 15 (7), s.29, 2017.
135. Rath, N., Rasputra, K., Liyanage, R, Huff G.& Huff, W. "Dithiocarbamate toxicity – an appraisal", *Pesticides in the modern world – effects of pesticides exposure*, Croatia, *InTech*, s.323–340 Rijeka 2011 .
136. United States Environmental Protection Agency (EPA), "Reregistration Eligibility Decision for Thiram" *United States Environmental Protection Agency*, Washington, 2004.
137. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA), "Evolution of the new insectide Methoxyfenozide" 2002. Available: <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/13851-prs-methoxyfenozide.pdf>. [Erişildi: 2021].
138. European Food Safety Authority (EFSA) "Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance methoxyfenozide", *Efsa Journal*, 1-24, 2017.

139. Sehgal, R. Roy S., Kumar, V., "Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and Podophyllotoxin in *Allium cepa* root mode", *Biocell*, cilt 30(1), 9-13, 2006.
140. Ivanova, E., Staikova, T., Velcheva, I., & Kostadinov, K., "Somatostatic Effect of Heavy Metal Contaminated Waters In The Region of The Town Of Panagjurishte, Bulgaria." *Journal of Environmental Protection*, 4(2), 284-287.2003.
141. Oney-Birol, S., "Exogenous L-carnitine promotes plant growth and cell division by mitigating genotoxic damage of salt stress". *Scientific Reports*, 9(1), 17229, 2019.
142. Würgler, F. & Vogel, E., "In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*", Chemical mutagens, principle and methods for their detection, Editörler: F. Würgler ve E. Vogel, *Plenum Pres*, New York, s. 1-73 1986.
143. Frei, H., & Würgler, F. E. , Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.1988.
144. Kastenbaum, M. A., & Bowman, K. O., "Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies", *Mutation research*, 9, 527-49.1970.
145. Yüzbaşıoğlu, D., Zengin N. & Ünal, F., "Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri" *The Journal Of Food*, 39(3), 179-186, 2014.
146. Şekeroğlu Z. A. & Şekeroğlu, V., "Genetik Toksisite Testleri", *TUBAV*, 4(3), 221-229, 2011.
147. Villani, P., Andreoli, C., Crebelli, R., Pacchierotti, F., Zijno, A., & Carere, A., "Analysis of micronuclei and DNA single-strand breaks in mouse splenocytes and peripheral lymphocytes after oral administration of tetramethylthiuram disulfide (thiram)", *Food and chemical toxicology*, 36(3), 155-164 1998.
148. Santovito, A., Cervella, P., Delpero, M., "Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with the fungicide, Thiram". *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3), 347-351, 2012.
149. Rai, B., Mercurio, S. D., " Environmentally relevant exposures of male mice to carbendazim and thiram cause persistent genotoxicity in male mice" *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 10629-10641,2020.

150. Børge, C., Brunborg, G., Wiger, R., Holme, J. A., Scholz, T., Dybing, E., Søderlund, E. J, "A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells", *Reproductive toxicology*, 10(6), 509-519.1996.
151. Franekić, J., Bratulić, N., Pavlica, M., Papeš, D. "Genotoxicity of dithiocarbamates and their metabolites" *Mutat Res*, 325, 65–74, 1994.
152. Donner, M., Husgafvel-Pursiainen, K., Jenssen, D., & Rannug, A., "Mutagenicity of rubber additives and curing fumes: results from five short-term bioassays", *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 27-37 1983.
153. Dulout, F. N., Olivero, O. A., Pastori, M. C., "The mutagenic effect of thiram analysed by the micronucleus test and the anaphase-telophase test", *Mutation Research Letters*, 105(6), 409-412,1982.
154. Hemavathi, E. Rahiman, M., "Effect of Ziram, Thiram, and Dithane M-45 on bone marrow cells of mice-assessed by micronucleus test", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*,56(2) 190-196, 1996.
155. Agrawal, R. C., Y. Shukla, and N. K. Mehrotra. "Assessment of mutagenic potential of thiram." *Food and chemical toxicology* 35(5) 523-525.1997.
156. Prasad, M. H., Pushpavathi, K., Rita, P., Reddy, P. P., The effect of thiram on the germ cells of male mice. *Food and chemical toxicology*, 25(9), 709-711,1987.
157. Hemavathi, E. Rahiman, M. "Toxicological effects of ziram, thiram, and dithane M-45 assessed by sperm shape abnormalities in mice", *Journal of Toxicology and Environmental Health*,38(4) 393-398, 1993.
158. Traina, M. E., Ade, P., & Urbani, E., "No evidence of effect on male mice germ cells after acute treatment with thiram", *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 7(4), 320-326.1994.
159. Hoshina, M., "Avaliação da possível contaminação das águas do RibeirãoClaromunicípio de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão," 2002.

160. Mercado, S. A. S., & Caleño, J. D. Q., "Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Science of the total environment*", 700, 134452, 2020.
161. Sharma S., Vig A. P., "Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diuron and quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay", *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 6(2), 90-95, 2012.
162. Verma, S., Srivastava, A., "Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa*" L.-A biomarker based study", *Chemosphere*, 206, 248-254.2018.
163. Yüzbaşıoğlu, D., "Cytogenetic Effects of Fungicide Afugan on the Meristematic Cells of *Allium cepa* L", *Cytologia*, 68(3) 237–243, 2003.
164. Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Arslan, O., Kasap, R., " Effects of Dinocap on the Mitosis of *Allium cepa* L.", *Cytologia*, 70(1), 13-22, 2005.
165. Verma, S., Srivastava, A., "Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay," *Environ Monit Assess*, 190, 238, 2018.
166. Selvaraju, S., Vasanth, M., Rajarajan, R., Muralidharan, R., & Raghupathy, V., "Genotoxic Effects of Carbendazim (fungicide) on the Root Apicalmeristems of *Allium cepa* L"., *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 29-33, 2015.
167. Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., "Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by propham and chlorpropham", *Cytobios*, 57(228), 7-14, 1989.
168. Majewska, A., Wolska, E., Śliwińska, E., Furmanowa, M., Urbańska, N., Pietrosiuk, A., & Kuraś, M., "Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots", *Caryologia*, 56(3), 337-351.2003.
169. Türkoğlu S., "Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay", *Pesticide Biochem Physiol*, 103(3), 224-230, 2012.

170. Amer S. Ali, E., "Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*", *Cytologia*, 39, 633-643, 1974.
171. Soliman, M. & Ghoneam, G., "The mutagenic potentialities of some herbicides using *Vicia faba* as a biological system", *Biotechnology*, 3(2), 140–154, 2004.
172. Singh, P., Srivastava, A. K., Singh, A. K., "Comparative sensitivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) to insecticide and fungicide on different stages of cell cycle", *Pesticide Biochemistry and physiology*, 89(3), 216-219, 2007.
173. Fisun, K., Rasgele, P. G., "Genotoxic effects of raxil on root tips and anthers of *Allium cepa* L." *Caryologia*, 62(1), 1-9.2009.
174. Wu, K. D., Grant, W. F., "Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*)". *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 8(3), 481-501, 1966.
175. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak, C., Kasap, R., "Cytological effects of the herbicide racer "flurochloridone" on *Allium cepa*", *Caryologia*, 56(1), 97-105, 2003.
176. A.A, El-Ghamery, El-Nahas A.I, and Mansour M M. "The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*." *Cytologia* 65(3) 277-287.2000.
177. Nassar, M., Boulassel, R., Bouhabel, N., Djeghader, S., Seghir, K., "Cytotoxic effect and chromosomal damages induced by the methanolic extract of *Cytisus triflorus* assessed by *Allium* test". *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(10), 28-34.2021.
178. Macar, Ö., Tuğçe, K. M., Yalçın E., Çavuşoğlu, K., "Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in *Allium cepa* L"., *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 391–2399, 2020.
179. Mustafa, Y., Suna Arıkan, E., "Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay", *Caryologia*, 61(1), 45-52, 2008.
180. McGill, M., Pathak, S., & Hsu, T. C., " Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness" *Chromosoma*, 47 (2), 157-166, 1974.



181. Klášterská, I., A. T. Natarajan, and C. Ramel. "An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations." *Hereditas* 83 (2) 153-162 1976.
182. Gill, R., Shaukat, S., "Genotoxic effects of captan fungicide on root meristems of *Allium cepa* L. in vivo," *Pakistan Journal of Biological Sciences*,3(1), 114-117, 2000.
183. Fatma, F., Verma, S., Kamal, A., Srivastava, A. "Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay", *Chemosphere*, 195, 864-870.
184. Miron, L., Beleniuc, G., Doroftei, E. , "Cytogenetic effects of the commercial fungicide Topas 100EC on meristematic root cells of *Allium cepa* L.," *17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM Vienna GREEN Conference Proceedings*, Vienna, 185-192, 2017.
185. Shanthi, R., Krishnamoorthy, M., "Genotoxic evaluation of a systemic fungicide ferbam in *Allium cepa* root meristematic cells", *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 5(2), 237-241, 2003.
186. Rasgele, P. G., "Assessment of Geno-and Cytotoxic Effects of Propineb Using Onion Apical Root Meristem", *Cytology and Genetics*, 57 (1) 95-103, 2023.
187. Akpınar I., "Thiramın Domates (*Lycopersicon esculentum* Miller) Bitkisi Üzerine Fizyolojik Etkileri", *İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 2014.
188. Deveci Özkan A., & Aksoy, Ö."Determination of Pesticide-Induced Genotoxicity on Soybean (*Glycine max* L.)" *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 83-87, 2019.
189. Mosallanejad, H., Badisco, L., Swevers, L., Soin, T., Knapen, D., Broeck, J. V., & Smagghe, G., "Ecdysone signaling and transcript signature in *Drosophila* cells resistant against methoxyfenozide". *Journal of insect physiology*, 56(12), 1973-1985, 2010.
190. Sames, J., Streelman D., "*Salmonella typhimurium* gene mutation assay (Ames test)" report No. 94R-258, 91176 from *Rohm and Haas Co. Submitted to WHO by Dow Agrosciences*, Indianapolis, USA, 1995.

191. Sames, J., Ciaccio P., "RH-112,485 2F: *Salmonella typhimurium* gene mutation assay (Ames test.)" Unpublished report No. 96R-163, 91184 from *Rohm and Haas Co. Submitted to WHO by Dow Agrosciences*, Indianapolis, USA, 1996.
192. Sames, J. & Ciaccio P., "RH-117,236 technical: *Salmonella typhimurium* gene mutation assay (Ames test),» Unpublished report No. 97R-150, 91183 from *Rohm and Haas Co. Submitted to WHO by Dow Agrosciences*, Indianapolis, USA, 1998.
193. Sames, J. & Black, K.. "RH-112,485: micronucleus assay in CD-1 mouse bone marrow cells", Unpublished report No. 94R-259, 91181 from *Rohm and Haas Co. Submitted to WHO by Dow Agrosciences*, Indianapolis, USA, 1995.
194. Sames, J. & Ciaccio P., "RH-112,485 2F: micronucleus assay in CD-1 mouse bone marrow cells", Unpublished report No. 97R-058, 91180 from *Rohm and Haas Co. Submitted to WHO by Dow Agrosciences*, Indianapolis, USA, 1997.
195. Bıçakçı, U., Çavuşoğlu, K., Yapar, K., Yalçın, E., "*Allium cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Diazinon Toksisitesinin Araştırılması", *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 49-56, 2017.
196. Mesi, A., Kopluku, D., "Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L.," *Procedia Technology*, 8, 19-26., 2013.
197. Fioresi, V. S., de Cássia Ribeiro Vieira, B., de Campos, J. M. S., & da Silva Souza, T., "Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem" *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 28066-28076, 2020.
198. Mesi A. & D. Kopluku, D., "Cyto- and Genotoxic Activity of Pesticide Cypermex Plus 550 EC on *Allium cepa* L"., *Int. Environmental Application & Science*, 10(4) 475-481, 2015.
199. Chauhan, L., Saxena, P., ve Gupta, S., "Effects of Deltamethrin on the Ultrastructures of the Root Meristem Cells of *Allium cepa*", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64, 135-147, 1999.
200. Chauhan, L. K. S., Saxena, P. N., Gupta, S. K., "Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa* Pesticide biochemistry and physiology, 64 (3), 181-189, 1999.

201. Inceer, H., Hayirlioglu-Ayaz, S., Ozcan, M., "Genotoxic effects of the insecticide cypermethrin on the root meristem cells of sunflowers (*Helianthus annuus* L.)", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83, 652-656 ,2009.
202. Karaismailoglu M. C. & Inceer, H., "Evaluation of potential genotoxic and cytotoxic effects of deltamethrin insecticide on somatic chromosomes of *Helianthus annuus* L," *Caryologia*, 70(4) 295-301, 2017.
- 203 Karaismailoğlu, M. "The Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Pyriproxyfen Insecticide on *Allium cepa* Somatic Chromosomes with Mitotic Activity, Chromosome Abnormality and Micronucleus Frequency", *Turkish Journal of Life Sciences*,1(2), 65-69, 2016.
204. Rank, J. "The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay", *Ekologija*, 1(1), 38-42, 2003.
205. Graf U., Van S. & Würigler, F., " *Drosophila* Genetics, A Pratical course", *Springer-Verlag Press*, New York, s. 236, 1992 .
206. Koksall P. Gürbüz, M., "Analysis of genotoxic activity of ketamine and rocuronium bromide using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 39, 628–634., 2015.
207. Sarıkaya R. & Solak, K., "Benzoik Asitin *Drosophila melanogaster* de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması", *Gazi Eğitim Fakültesi, Dergisi*, 23(3), 19-32, 2003.
208. Sarıkaya, R., Erciyas, K., Kara, M. I., Sezer, U., Erciyas, A. F., & Ay, S., "Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of boron by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*". *Drug and chemical toxicology*, 39(4), 400-406, 2016.
209. Carmona, E. R., Creus, A., & Marcos, R., "Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 724 (1-2), 35-40, 2011.
210. Carmona, E. R., Inostroza-Blancheteau, C., Obando, V., Rubio, L., & Marcos, R., "Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791, 1-11.

211. Uysal, H., Çelik H., "Drosophila melanogaster'in farklı soylarında astaksantin'in in vivo kronik etkilerinin belirlenmesi", *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(1), 135-146, 2021.
212. Kurşun, A., Güneş, M., Yalcin, B., Ertuğrul H., Kaya, B., "Bazı Fungusitlerin Genotoksik Potansiyellerinin *Drosophila* SMART ve KOMET Yöntemleri ile Araştırılması", *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(1), 122-131, 2022.
213. Aguirrezabalaga, I., Santamaría, I., & Comendador, M. A., "The w/w+ SMART is a useful tool for the evaluation of pesticides", *Mutagenesis*, 9(4), 341-346,1994
214. Marchal-Ségault, D., Seuge, J., & Lauge, G., "Studies on the toxicity of some carbamate fungicides in *Drosophila melanogaster* Meig.(Insecta, Diptera)". *Environmental research*, 37(1), 26-32, 1985
215. Osaba, L., Rey, M. J., Aguirre, A., Alonso, A., & Graf, U., "Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(1), 95-106,2022.
216. Karadeniz, A., Kaya, B., Savaş, B., & Topcuoğlu, Ş. F., "Effects of two fungicides, cyprodinil and fludiox-onil, on genotoxicity in *Drosophila* smart assay and on proliferation and viability of HEK293 cells from the perspective of carcinogenesis", *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5), 1920-1925, 2015.
217. Rahden-Staron, I., "The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*", *Mutation Research*, 518, 205-213, 2002.
218. Demir, E., Kaya, B., Kocaoglu Cenkci, S., Cetin, H., & Marcos, R., "In vivo Genotoxicity of Four Synthetic Pyrethroids with Combinations of Piperonyl Butoxide (PBO) Using the *Drosophila* SMART Assay" *Ekoloji Dergisi*, 23(92), 2014
219. Aciole, E. H. P., Guimaraes, N. N., Silva, A. S., Amorim, E. M., Nunomura, S. M., Garcia, A. C. L & Rohde, C., "Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pest management science*, 70(4), 559-565, 2014.

220. Ekebaş, S., Çakır, Ş., Ertuğrul O., & Kence, A., "Bazı Kimyasal Maddelerin (Azametifos, Diklorvos, Metil parathion, Aflatoksin B1) Mutajenik Etkisinin *Drosophila melanogaster*'de SMART Yöntemi ile Araştırılması", *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24(6), 563-569, 2000.
221. Budak, A., "The Detection of genotoxic activity of the deltamethrin and permethrin by somatic mutation and recombination test with *Drosophila Melanogaster*," *Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(1), 87-93, 2005.
222. Osaba, L., Aguirre, A., Alonso, A., & Graf, U., "Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila wing spot test*", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(1), 49-61, 1999
223. de Morais, C. R., Bonetti, A. M., Carvalho, S. M., de Rezende, A. A. A., Araujo, G. R., & Spanó, M. A., "Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*", *Chemosphere*, 165, 342-351, 2016
224. de Morais, C. R., Carvalho, S. M., Naves, M. P. C., Araujo, G., de Rezende, A. A. A., Bonetti, A. M., & Spanó, M. A., "Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiamethoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*", *Chemosphere*, 187, 163-172, 2017