



Investigation of cytotoxic effects of pyridine in root meristem cells of onion (*Allium cepa*)

Hülya SİVAS^{*1}, Sevim GÖKBAYRAK²

¹ Anadolu University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Eskişehir, Turkey.

² Afyon Kocatepe University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Afyon, Turkey

Abstract

Pyridine as a nitrogen-containing heterocyclic substance and its derivatives exist in both surface and ground water because of its use in a variety of food, medicinal and chemical industrial products. In the present work, cytotoxic effect of pyridine has been investigated for the first time in a plant, on root-tip growth and the meristem cells of onion (*Allium cepa* L.). Different concentrations of pyridine significantly affected the growth and morphology of onion roots causing shorter, thicker and gelatin like structures compared to the control. An increase in the pyridine doses caused an increase in mitosis abnormalities in the squashes prepared from the cells of root-tip meristem whereas the mitotic index was diminished. Mitosis abnormalities have been observed generally as anaphase bridges, stickiness, anaphase-telophase aberrations and c-metaphase. As a result, pyridine at low doses has been significantly cytotoxic on the meristem cells of onion root-tip. Thus, we suggest that toxic effects of pyridine may be investigated and the mechanisms may be evaluated in different systems for human health.

Key words: Pyridine, Cytotoxic Effect, *Allium cepa*, Onion

----- * -----

Piridinin sitotoksik etkilerinin soğan (*Allium cepa*) kök meristem hücrelerinde araştırılması

Özet

Azot-içeren heterosiklik bir madde olan piridin ve türevleri besin, tıbbi olarak ya da kimya sanayi gibi endüstriyel aktiviteler sonucu oluşmakta ve hem yüzey hem de yer altı sularında yaygın olarak bulunmaktadır. Bu çalışmada, piridin soğan (*Allium cepa* L.) köklenmesi ve kök-ucu meristem hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi ilk kez araştırılmıştır. Farklı dozlardaki piridin soğan köklerinin büyümesini ve morfolojisini doza bağlı olarak önemli derecede etkilemiş, kontrole göre daha kısa, kalın ve jelimsi yapılar olarak gelişmesine neden olmuştur. Kök ucu meristem hücrelerinden hazırlanan ezme-preparatlarda, piridin dozlarındaki artış mitotik indeksin düşmesine neden olurken, mitoz anomalilerinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Mitoz anomalileri genellikle anafaz köprüsü, yapışkanlık, bozulmuş anafaz-telofaz ve c-metafaz oluşması şeklinde gözlenmiştir. Sonuç olarak, düşük dozlardaki piridin soğan kök-ucu meristem hücreleri üzerinde önemli derecede sitotoksik olmuştur. Bundan dolayı, insanların sıklıkla maruz kaldığı piridin toksik etkisi farklı sistemlerde de araştırılmalı ve etki mekanizması aydınlatılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Piridin, Sitotoksik Etki, *Allium cepa*, Soğan

1. Giriş

Çevre kirliliğinin sağlık ve yaşam uzunluğu gibi çeşitli alanlarda yaşam kalitesini düşürdüğü çok iyi bilinmektedir. Kirlleticiler sağlık üzerindeki direk etkilerinin yanı sıra toksik ya da mutajenik etkileri yoluyla da kardiyovasküler hastalıklar, erken yaşlanma ve kanser gibi çeşitli sorunlara neden olabilmektedir. Bu nedenle genotoksisite çalışmaları oldukça önem kazanmış ve bilinmeyen çevresel ajanların olası genotoksik ve biyolojik etkilerini değerlendirmek için 200'den fazla kısa-zamanlı yöntem geliştirilmiştir (Kilbey vd., 1984; Gopalan, 1999;

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223350580; Fax.: +902223204910; E-mail: hulsiva@hotmail.com

Yücel vd., 2008; Sözen vd., 2010). Çevresel ve endüstriyel ajanların genotoksik potansiyellerini değerlendirebilmek amacıyla *Arabidopsis thaliana*, *Tradescantia*, *Vicia faba* and *Allium cepa* bitkileri araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup, bu bitkilerin kök meristem mitotik hücrelerinde çeşitli sitolojik kriterler değerlendirilmektedir (Ma vd., 1997; Gopalan, 1999; Monarca vd., 2000; Migid vd., 2007; Konuk vd., 2007; Olorunfemi vd., 2011). Bunlardan yaygın olarak kullanılan *Allium test*, kök meristem mitotik hücrelerinin hem mikroskobik (c-mitozis, kromozom kırılması ve yapışkanlığı, anafaz-telofaz kromozom anomalileri, mikro çekirdek oluşumu ve mitotik indeks) hem de makroskobik parametrelerin (kök uzunluğu, şekli ve EC₅₀ değeri) araştırılmasına elverişli olan basit, hassas ve güvenilir bir testtir (Fiskesjö, 1993; Kaymak, 1996; Rank ve Nielsen, 1997; Te-Hsiu, 1999; Gömürgen, 2000; Monarca vd., 2000; Ateeq vd., 2002; Patra vd., 2005; Türkoğlu, 2007). Boya ve metal sanayi gibi faaliyetler sonucu oluşan endüstriyel sıvı atıkların çevreye ve canlılara verdiği zararlar *Allium test* ile araştırılmış, sanayi atık sularının *Allium* kök meristem hücreleri üzerinde mitotik indeksi anlamlı ölçüde baskıladığı, kromozom anomalisi ve mikro çekirdek oluşumunu da arttırdığı gösterilmiştir (Chandra vd., 2005).

Piridin kötü kokulu renksiz bir sıvı madde olup endüstriyel çözücü olarak kullanılmasının yanı sıra ilaçlar (fungusit, herbisit ve insektisit), vitaminler, besin tatlandırıcılar, boyalar, kauçuk ürünleri ve yapıştırıcılar gibi çok farklı ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Azot-içeren heterosiklik kirleticilerin önemli temsilcilerinden bir tanesi olan piridin ve türevleri, sentetik yakıt ve kimya sanayi gibi endüstriyel aktiviteler sonucu hem yüzey hem de yer altı sularında bulunmaktadır (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995). Bitki ve hayvanlar tarafından doğal olarak üretilen nikotin, anabazin ve kavadin gibi piridin türevleri doğal pestisitler olarak yıllardır kullanılmaktadır (Sims ve O'Loughlin, 1989; Kaiser vd., 1996). Piridin ve türevleri kolayca suda çözünebilir özelliğine sahiptir ve ayrıca toprak ve sudaki materyallerin içindeki organik bileşenlere düşük oranda tutunma eğilimi gösterir. Bundan dolayı sucul materyallerden, sedimentlerden ve topraktan taşınarak akarsu ve nehir ağzlarında kirlenmeye neden olurlar (Riley vd., 1981). Yakın zamanda yapılan bir çalışmayla tatlı su canlılarında toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Singh vd., 2008). Geniş bir kullanım alanı olan piridin olası toksik etkilerinin araştırılması son derece önemlidir. İnsanın piridine maruz kalmasının başta karaciğer hastalıkları olmak üzere, sinir sistemi hastalıkları ve böbrek rahatsızlıkları gibi bazı sağlık sorunlarına yol açtığı yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (National Toxicological Program, 2000).

Piridin *Salmonella* (Haworth vd., 1983; Gold ve Zeiger, 1997), fare lenfosit ve eritrositleri (Mc Gregor vd., 1988) ve CHO (Chinese hamster ovary) hücrelerinde nokta mutasyonları, kardeş kromatid değişimi, mikro çekirdek ve kromozom aberasyonu oluşumu gibi genotoksik etkileri araştırılmış ve bu parametreler üzerine bir etkisinin bulunmadığı rapor edilmiştir (National Toxicological Program, 2000). Ayrıca piridin beslenme yoluyla verildiğinde *Drosophila melanogaster* üzerinde mutajenik bir etkisi olmadığı, ancak enjeksiyon ile verildiğinde mutajenik olduğu gözlenmiştir (Mason vd., 1992; Foureman vd., 1994). Yapılan bir diğer çalışmayla piridin oositlerde homolog kromozomların ayrılmasına neden olduğu bulunmuştur (Munoz ve Barnett, 2003). *In vivo* çalışmalar kemirgenlerde piridin mutajenik ve klastojenik olmayan mekanizmalarla kanserojenik etkiye sahip olduğunu (National Toxicological Program, 2000) ve ayrıca teratogenik etkisi bulunduğunu göstermiştir (Jori vd., 1983). Halojenli piridinler dahil bazı piridin içeren bileşiklerin genotoksik aktiviteye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla da gösterilmiştir (Claxton vd., 1987; Gooderham vd., 2002; Zeytinoglu vd., 2006).

Bu çalışmada, çeşitli ekosistemlerde yaygın olarak bulunan ve sitotoksik etkileri ve etki mekanizması bakımından çelişkili bulgular bulunan piridin maddesinin mitotik indeks (MI) ve kromozomlar üzerine olası etkisinin ilk kez soğan (*Allium cepa*, Alliaceae, 2n = 16) kök ucu meristem hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

Deneyde kullanılacak olan Soğan (*Allium cepa*) yumruları ticari olarak yerel pazardan satın alınmıştır. Yaklaşık eşit büyüklükte seçilen soğanların kurumuş dış kabukları ve kökleri uzaklaştırıldıktan sonra, saf su ile dolu beherlerin üzerine yerleştirilmiştir. Beherdeki sular 24 saatte bir değiştirilmek suretiyle, köklendirme oda ısısında (20-22 °C) gerçekleştirilmiştir. Kök uçları 1-3 cm'ye ulaştıktan sonra en iyi köklenmiş olan soğanlardan her doz için 3 adet soğan seçilerek piridin (Sigma) farklı dozları ile (125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm) 72 saat muamele edilmiştir. Bu süre boyunca test sıvıları 24 saatte bir değiştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak % 0.01'lik sodyum azid (NaN₃, Riedel) (Rank ve Nielsen, 1993, 1997) ve negatif kontrol olarak saf su içinde aynı işlem uygulanmıştır. Sitolojik preparatlar asetokarmin ezme tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (Grant, 1982). Bunun için kök uçları 72 saat uygulama süresi sonunda hemen kesilerek saf su ile yıkanmış ve etil alkol - asetik asit (3:1, v/v) içerisinde +4 °C'de 24 saat tespit edilmiştir. Distile suda yıkanan kök uçları daha sonra %1'lik aseto-karmin ve 1 N HCL (10:1 v/v) içinde kaynatılıp soğutulularak boyama ile birlikte hidroliz işlemleri gerçekleştirildi. Boyanan kök uçları %45 asetik asit içine alınarak yine aynı ortamda her örnekten 2-3 kök ucu olmak üzere lam üzerine alınarak ezme preparatları hazırlanmıştır. Her örnekten en az 10 kök ucu alınarak ezme preparatları hazırlanmıştır. Dikkatlice örneklerin üzerine kapatılan lamelin etrafı turnak cilası ile kapatıldıktan sonra BX50 Olympus araştırma mikroskobunda incelenmiştir. Her deney setinde her doz için üçer olmak üzere en 3 ayrı deney seti kurulmuştur.

Preparatlar, kromozom yapışmaları ve kümeleşmeleri, mitozda meydana gelen düzensizlikler, anafaz - telofaz köprüleri, mikro çekirdek ve binükleer hücre gibi anomaliler göz önüne alınıp sayılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca mitotik indeks, bölünen hücrelerin toplam hücre sayısına oranı (MI; mitotik indeks = Mitotik hücre sayısı /

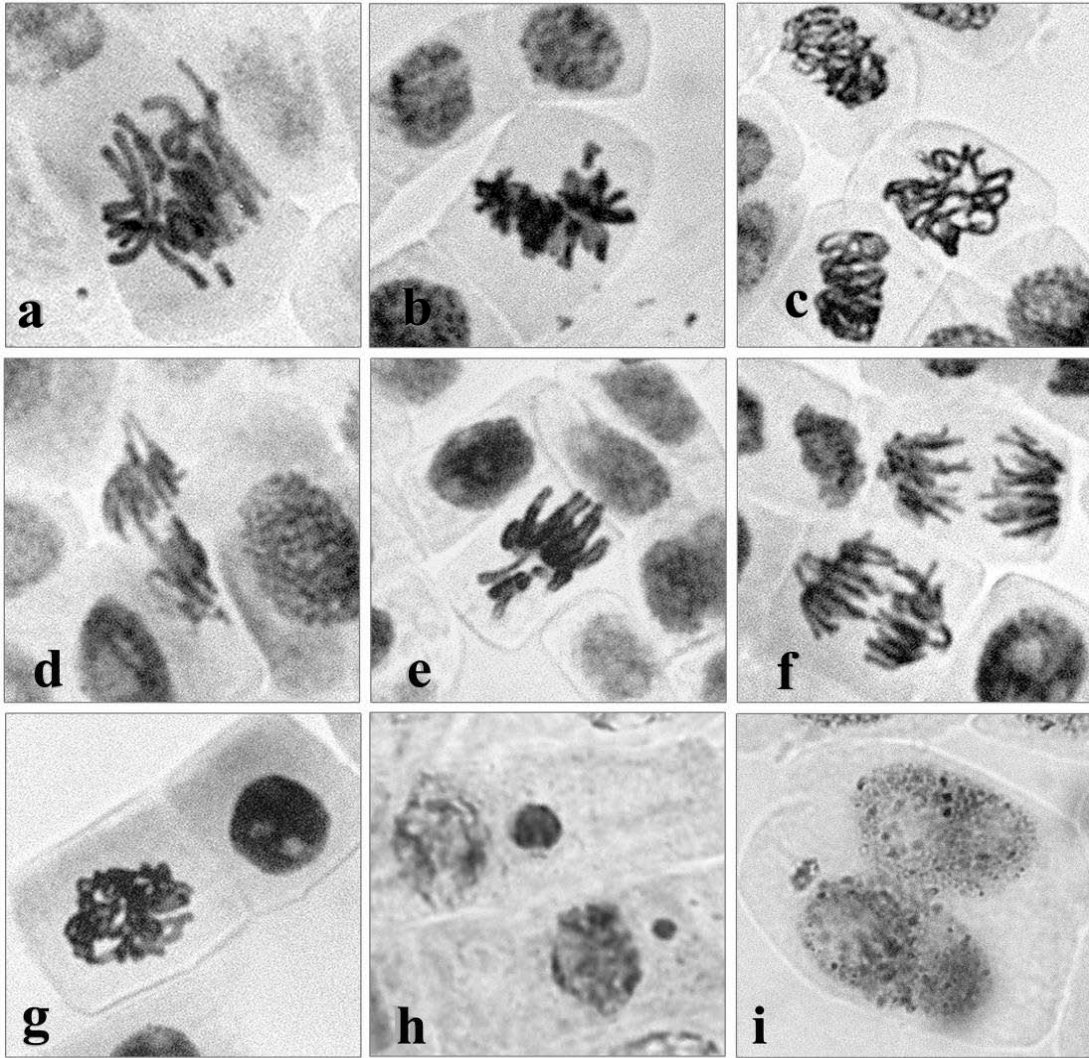
Toplam hücre sayısı X 100) olarak hesaplanmıştır (Jones ve Rickards, 1991). Anomaliler ise anomali görülen hücrelerin sayısının toplam hücre sayısındaki yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Sayımlar her örnekten en az üç preparat hazırlanarak toplamda en az 3700 hücre sayılarak yapılmış ve değerlendirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi “SPSS 11.0 for Windows” paket programında Kruskal-Wallis testi ile yapılmış olup, ikili karşılaştırmalarda Duncan testi kullanılmıştır.

Ayrıca, piridin köklenmeye daha uzun süredeki etkisini gözlemlemek için 72 saat boyunca piridin belirlenen dozlarına, sodyum azide ya da yalnızca distile suya maruz bırakılmış soğan köklerinin boyları ölçülmüş ve morfolojik yapıları için fotoğrafları çekilmiştir. Büyümenin, negatif kontrole göre inhibisyon yüzdesi “% İnhibisyon = Negatif kontrol kök uzunluğu - Kök uzunlukları / Negatif kontrol kök uzunluğu X 100” formülü ile hesaplanmıştır (Jones ve Rickards, 1991).

3. Bulgular ve tartışma

Bu çalışmada sentetik yakıt, kimya ve ilaç sanayi gibi çeşitli endüstriyel aktivitelerde yaygın olarak kullanılan piridin maddesinin sitotoksik ve genotoksik etkisi ilk kez bir bitkide araştırılmıştır. Bir ön çalışma ile 2000 ppm piridin dozunun Soğan’da (*Allium cepa*) oldukça toksik olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, deneylerde soğanlar bu dozun altında, iki kat aralıklarla belirlenen piridin dozlarına maruz bırakılarak köklendirilmiştir. Seçilen bu değerler aynı zamanda literatürde kullanılan piridin doz değerleri arasında bulunmaktadır (Haworth vd., 1983).

Soğan kök ucu meristem hücrelerine uygulanan farklı piridin dozları mitoz bölünmenin evrelerini olumsuz yönde etkilemiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Piridin içinde büyüyen Soğan (*Allium cepa*) kök ucu meristem hücrelerinde gözlenen bazı sitolojik anomaliler a-b-c) C-mitoz, metafazda fragment ve kromozom yapışkanlığı, d-e-f) Anafazda kromozom köprüleri ve eliminasyonu, g) Kromozom yoğunlaşması, h) Mikroçekirdek ve i) Mikroçekirdek içeren binükleer hücre.

Figure 1. Some cytological abnormalities in meristem cells of root-tip of onion grown in pyridine

a-b-c) C-mitosis, fragment and chromosome stickness in metaphase, d-e-f) Chromosome bridge and elimination in anaphase, g) Chromosome condensation, h) Micronucleus and i) Binuclear cell with micronucleus.

Piridin 125, 250 ve 500 ppm dozlarına maruz kalan hücrelerde kromozom köprüsü, yapışkanlık, bozulmuş metafaz-anafaz ve c-metafaz gibi anomaliler bölünme evrelerinin tümünde tespit edilmiştir. 1000 ve 2000 ppm gibi yüksek doz piridin içinde büyüyen kök ucu meristem hücrelerinde ise erken profaz ve interfaz dışında çok az mitotik evreye rastlanmıştır. Ayrıca, 250-2000 ppm piridin uygulaması sonucu çekirdeklere parçalanmalar, şekil bozuklukları ve hücre merkezinden bir kutba kayma gözlenmiştir (bulgu verilmemiştir). Kromozom köprüsü oluşumu hariç belirtilen anomalilerin tümü bu hücrelerde gözlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1’de gösterildiği gibi uygulanan dozlara bağlı olarak bu etkiler farklılık göstermektedir. Negatif kontrol grubu olan saf suda köklendirilmiş soğanların hücreleri ile karşılaştırıldığında anomali yüzdesi ve bölünen hücre sayısı doza-bağımlı bir şekilde önemli derecede ($p < 0.05$) azalmıştır. MI değerlerindeki düşüş negatif kontrole göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) 59.69 ± 0.5^a - 4.87 ± 0.9^c arasında olurken, az sayıda bulunan mitotik hücrelerdeki anomali yüzdesi de doz artışıyla beraber önemli derecede 0.71 ± 0.1^{cdf} ’den 0.45 ± 0.1^b değerine düşüş göstermiştir. Bu düşüş muhtemelen piridin yüksek dozlardaki kuvvetli sitotoksik etkisinin kromozom anomalisi oluşturmasının önüne geçmesinden dolayıdır. Diğer yandan piridin etkisi pozitif kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında kromozom anomalisi artışı bazında özellikle 125 ppm’lik dozda büyük oranda ($p < 0.05$) benzerlik göstermiştir.

Tablo 1. Soğan (*Allium cepa*) kök ucu meristem hücrelerinde piridin tarafından indüklenen kromozom aberasyon oranı ve mitotik indeks (MI)

Table 1. Mitotic index (MI) and chromosome aberration ratio induced by pyridine in root-tip meristem cells of Onion (*Allium cepa*)

Piridin (ppm)	Toplam hücre sayısı	Mitotik hücre sayısı	MI \pm S.D %	Anomaliler						Anomali (%) \pm S.D
				A	B	C	D	E	F	
125	6102	3647	59.69 ± 0.5^a	13	17	8	7	-	-	0.71 ± 0.1^{cdf}
250	5790	3330	57.65 ± 1.4^a	6	12	9	8	-	-	0.59 ± 0.1^{bce}
500	6039	2960	49.10 ± 8.5^b	6	17	5	5	-	-	0.53 ± 0.0^{bce}
1000	5554	2640	4.87 ± 0.9^c	-	2	4	6	3	9	0.45 ± 0.1^b
Saf su	-	8522	79.06 ± 2.1^e	-	-	2	-	-	-	0.04 ± 0.0^a
NaN ₃ %0.01	4884	3556	72.77 ± 3.1^d	5	15	7	3	13	-	0.88 ± 0.0^d

A: kromozom köprüsü, B: yapışkanlık, C: bozulmuş metafaz-anafaz, D: c-metafaz, E: mikro çekirdek ve F: çift-çekirdekli hücre. NaN₃= sodyum azid pozitif ve saf su negatif kontrol. Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Piridin farklı dozlarının soğan köklenmesi üzerine etkisinin makro düzeyde araştırılması için 15 gün boyunca soğanlar köklenmeye bırakılmış ve kök uzunlukları ölçülmüştür. Bu süre sonunda kök uzunluklarının doza bağlı olarak önemli derecede etkilendiği görülmüştür. Yapılan ölçümlere göre 125 - 2000 ppm piridin içerisinde bekleyen köklerin uzunluğu kontrole göre %62,5 – 90,7 oranında daha kısa kalmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Piridin 15 gün sonunda Soğan (*Allium cepa*) kök uzunluğu gelişimine etkisi.

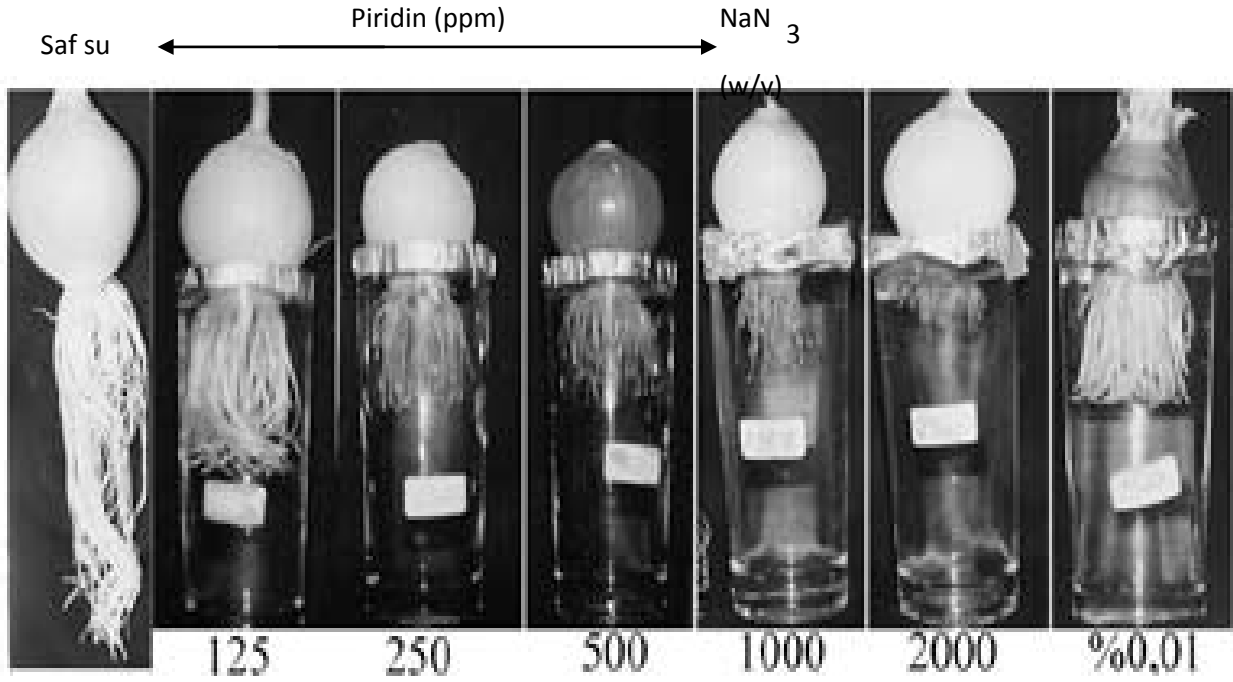
Table 2. Effects of pyridine on the development of root length of Onion (*Allium cepa*) after 15 days

Piridin (ppm)	Kök uzunluğu (cm)		Kök uzunluğu inhibisyon oranı (%)
	125	6.0	62.5
250	4.0	75.0	
500	3.5	79.0	
1000	2.5	84.5	
2000	1.5	90.7	
NaN ₃ % 0.01	4.0	75.0	
Saf su	16.0	0.0	

NaN₃: Sodyum azid (w/v) (+) kontrol ve saf su (-) kontrol olarak kullanılmıştır.

Kök morfolojisi incelendiğinde Şekil 2’de gösterildiği gibi yüksek piridin varlığında (500, 1000 ve 2000 ppm) kontrole göre saçak köklerin renginin koyulaşıp kalınlaştığı ve jelimsi yapı kazandığı gözlenmiştir

Her yıl binlerce yeni kimyasal bileşik üretilmekte ve çevreye verilmektedir. Sentezlenen bu bileşiklerin olası mutajenik ve karsinojenik aktivitelerinin belirlenme oranı ise üretim oranlarının çok altında kalmaktadır. Ekosistemin temel üyeleri olan bitkiler çevresel streslere diğer biyometod sistemlerinden daha duyarlı olmalarından dolayı çevresel kirlenmeleri belirlemede uygun materyaller olarak kullanılmaktadır. Özellikle *Allium* testini de içeren üç önemli bitki biyometodu çevresel monitor olarak kullanılmak üzere IPCS (International Programme on Chemical Safety), ILO (International Labour Org.) ve WHO (World Health Org.) tarafından onaylanmıştır (Ma vd., 1997; Gopalan, 1999; Monarca vd., 2000).



Şekil 2. Piridin maddesinin farklı derişimlerinde 15 gün süreyle köklendirilmiş Soğan'lar (*Allium cepa*). NaN_3 : Sodyum azid %0.01 (w/v) (+) kontrol ve saf su (-) kontrol olarak kullanılmıştır.

Figure 2. Onions (*Allium cepa*) rooted in the various concentrations of pyridine substance for 15 days. NaN_3 : Sodium azide %0.01 (w/v) as (+) control and distilled water as (-) control were used.

Literatüre baktığımızda piridinin bitkiler üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmazken *in vivo* ve *in vitro* çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bakteriler ve hayvan hücreleriyle yapılan bu çalışmalarda, piridinin bakteri büyümesinin üzerinde her hangi bir etkisi görülmezken hayvan hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı rapor edilmiştir (Florin vd., 1980; Haworth vd., 1983). Piridinin oldukça yüksek bir dozunun (4300 ppm) kemirgenlerde mutajenik ve klastojenik etkileri olmadığı ileri sürülmüş, diğer yandan sekse bağlı çekinik öldürücü (SLRL) testinde pozitif sonuç vermiştir (Mason vd., 1992). Ayrıca Munoz ve Barrett tarafından (2003) yapılan bir çalışmada, piridin *Drosophila* oositlerinde kromozomların ayrılmamasına neden olmuş ve bu etkinin özgül hedeflerle etkileşim yoluyla meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bu sonuçların dışında bazı piridin metabolitlerinin mutajenik etkiye sahip olduğu çok az sayıdaki çalışma ile ortaya konulmuştur (Claxton vd., 1987; Gooderham vd., 2002; Zeytinoglu vd., 2006).

Bu çalışmada, daha önce yapılan farklı deney sistemlerinde etkisiz olduğu belirtilen düşük piridin dozlarının soğan kök ucu meristem hücrelerinde önemli derecede sitotoksik etkilere sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir. Bu etkiler MI'nin azalması, bozulmuş anafaz-telofaz ve c-metafaz oluşması gibi mitoz anomalileri ile kromozom köprüsü ve yapışkanlık gibi kromozom anomalisi şeklinde gözlenmiştir. En çok gözlenen anomali olan kromozom yapışkanlığı, nükleik asitlerin depolimerizasyonuna ya da nükleoproteinlerin ayrışmasına bağlı olarak ortaya çıkabilir ve anafaz ile telofazda oluşan kromozom köprülerinin de bir nedeni olabilir (Sahi ve Singh, 1996). Bu nedenle piridin *Allium* kök meristem hücrelerinde direk olarak DNA'nın depolimerizasyonunu ya da proteinlerin ayrışmasını etkileme yoluyla anomalilere neden olmuş olabilir.

Artan piridin dozlarına maruz kalan soğan kök meristem hücrelerinin MI değerindeki önemli azalma da piridinin mitozu baskıladığını göstermektedir. Diğer bazı herbisitler için ileri sürüldüğü gibi piridin maddesi de DNA'yı bir şekilde etkileyerek sentezini engelleyebilir ve böylece hücreler mitozu giremeyebilir (Gömürgen, 2000). Piridinin bir başka etki mekanizması ise Zimmerman ve arkadaşları (1986) tarafından, *S. cerevisiae*'da aneuploidiye neden olduğu ve muhtemelen bunun mikrotübül oluşumunu bozarak gerçekleştirdiği şeklinde ileri sürülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen bulgular piridinin her dozunun c-metafazyı uyardığını göstermesinden dolayı farklı organizmalarda da olsa Zimmerman ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir. Çalışmamızda piridin doz artışına bağlı olarak gözlenen, özellikle kromozom köprüsü, yapışkanlık ve bozulmuş anafaz-telofaz sayısındaki azalma gibi anomalilerin mikrotübül sentezinin ya da polimerizasyonunun engellenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. En yüksek dozda MI önemli derecede düşmüş olmasına rağmen hasarlı hücre sayısı aynı oranda düşmemiştir. Diğer bir deyişle azalan mitotik hücrelerin çoğunda anomali meydana gelmiştir. Bu dozlarda kromozom köprüsü hariç diğer anomalilere ek olarak çift çekirdekli hücreler ve az sayıda mikro çekirdek gözlenmiştir. Çift çekirdekli hücre oluşumunun protein sentezinin durması sonucu hücre bölünmesinin tamamlanamaması veya çeper kaynaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, sodyum azid (NaN_3)'in MI'yi pek etkilemediği, ancak etkilerinin daha çok

klastojenik ve iğ ipliklerini üzerine olduğu ileri sürülmüştür (Rank ve Nielsen, 1997). Bu çalışmada da pozitif kontrol olarak kullanılan sodyum azid tüm bu etkileri göstermiş, fakat piridinin etkileriyle karşılaştırıldığında c-metafaz evresi çok düşük oranda bulunmuştur. Gözlenen bu etkinin iğ ipliklerinin inhibe edilmesi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen tüm sonuçlar piridinin etkisinin genel olarak pozitif kontrol ile benzer tipte olduğunu, yüksek piridin dozlarında ise toksisitenin arttığını, yapısal elemanların olumsuz etkilendiğini ve mitoz için gerekli mekanizmaların engellendiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, insanın çok geniş alanlarda ve yaygın olarak karşı karşıya kaldığı bir kimyasal olan piridinin genellikle etkisiz olduğu birkaç çalışma dışında bu güne kadar yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda ileri sürülmüştür. Ancak, bu çalışma ile elde edilen bulgular düşük dozdaki piridinin soğan kök ucu meristem hücreleri üzerine oldukça önemli sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında toksik etki mekanizmasının daha detaylı olarak aydınlatılması için piridinin mutajenik, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin daha farklı sistemlerde araştırılması öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry ToxFAQs, U.S. Public Health Service. Toxicological Profile for Pyridine, September 1995.
- Ateeq, B., Abdul, F.M., Niamat, M., Ahmad, W. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*. 514: 105-113.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N., Gupta, S.K. 2005. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of the Total Environment*. 347: 46– 52.
- Claxton, L.D., Dearfield, K.L., Spanggord, R.J., Riccio, E.S., Mortelmans, K. 1987. Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome test. *Mutation Research*. 176: 185-198.
- Fiskesjö, G. 1993. *Allium* test 1: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the root growth of onions. *Environmental Toxicology Water Quality*. 8: 461-470.
- Florin, I., L. Rutberg, M. Curvall, C.R. Enzell. 1980. Screening of Tobacco Smoke Constituents for Mutagenicity Using the Ames Test. *Toxicology*. 18: 219-232.
- Fouremant, P., Mason, J.M., Valencia, R., Zimmering, S. 1994. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. Part X. Results of 70 coded chemical tested for the National Toxicology Program. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 23: 208-227.
- Gold, S., Zeiger, E. 1997. Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases. CRC Pres, Boca Raton.
- Gooderham, N.J., Zhu, H., Lauber, S., Boyce, A., Creton, S. 2002. Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Mutation Research-Fund Mol M*. 506-507: 91-9.
- Gopalan, H.N.B. 1999. Ecosystem health and human well being: The mission of the international programme on plant bioassays. *Mutation Research*. 426: 99-102.
- Gömürgen, A.N. 2000. Cytological effect of the herbicide 2,4-D isooctylester 48% on root mitosis of *Allium cepa* L. *Cytologia*. 64: 383-388.
- Grant, W.F. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the United States Environmental Protection Agency Gene Toxicity Program. *Mutation Research*. 99: 273-291.
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., Zeiger, E. 1983. *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environmental Mutagenesis* 5/suppl. 1: 3-142.
- Jones, R.N., Rickards, G.K. 1991. Practical genetics. John Wiley & Sons, New York.
- Jori, A.D., Clamari, D., Cattabeni, E., Di Domenico, A., Gali, C.L., Gali, E., Silano, V. 1983. Ecotoxicological profile of pyridine. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 7: 251-275.
- Kaiser, J.P., Feng, Y., Bollag, J.M. 1996. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiological Reviews*. 60: 483-493.
- Kaymak, F. 1996. Effects of aluminium (Al³⁺) on the root meristem cells of *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Turkish Journal of Biology*. 20: 139-145.
- Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. 1984. Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier, Amsterdam.
- Konuk, M., Liman R., Çiğerci, İ.H. 2007. Determination of genotoxic effects of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pakistan Journal Botany*. 39/1: 73-79.
- Ma, T.H., Grant, W.F., de Serres, F.J. 1997. The genotoxicity monitoring of the air, water and soil – a preliminary report of the International Program on Plant Bioassays (IPPB). *Mutation Research*. 379/ S99, Suppl. 1.
- Mason, J.M., Valencia, R., Zimmering, S. 1992. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*: VIII. Reexamination of equivocal results. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 19: 227-234.

- Mc Gregor, D.B., Brown, A., Cattanach, P., Edwards, I., Mcbridge, D., Riach, C., Caspary, W.J. 1988. Responses of the L5178Y tk⁺/tk mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 12: 85-154.
- Migid, H.M., Azab, Y.A., Ibrahim, W.M. 2007. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66/1: 57-64.
- Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzella, L., Zebrini, I., Bertanza, G., Pedrazzani, R. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research* 34: 4261-4269.
- Munoz, E.R., Barnett, B.M. 2003. Chromosome malsegregation induced by the rodent carcinogens acetamide, pyridine and diethanolamine in *Drosophila melanogaster* females. *Mutation Research*. 539: 137-144.
- National Toxicological Program. 2000. Toxicological and carcinogenesis studies of pyridine (CAS No. 110-86-1) in F344/N rats, Wistar rats and B6C3F₁ mice (drinking water studies), TR-470.
- Olorunfemi, D.I., Ogieseri, U.M., Akinboro, A. 2011. Genotoxicity Screening of Industrial Effluents using Onion bulbs (*Allium cepa* L. L.). *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*. 15/1: 211 – 216.
- Patra, J., Sahoo, M.K., Panda, B.B. 2005. Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L. L. *Mutation Research*. 581/1-2: 173-18.
- Rank J., Nielsen, M.H. 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*. 118: 49-53.
- Rank, J., Nielsen, M.H. 1997. *Allium cepa* L. anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*. 390: 121-127.
- Riley, R.G., Garland, T.R., Shiosaki, K., Mann, D.C., Wildung, R.E. 1981. Alkylpyridines in surface waters, groundwater, and subsoils of a drainage located adjacent to an oil shale facility. *Environmental Science & Technology*. 15: 697-701.
- Sahi, A.N., Singh, R.N. 1996. Fly-ash induced chromosomal aberration in *Allium cepa* L. *Cytobios*. 86: 23-28.
- Singh, B.B., Chandra, R., Sharma, Y.K. 2008. Effect of pyridine and formaldehyde on a Macrophyte (*Lemna minor* l.) and a sludge worm (*Tubifex tubifex* Müller) in fresh water microcosms. *Applied Ecology and Environmental Research*. 6/2: 21-35.
- Sims, G.K., O'Loughlin, E.J. 1989. Degradation of pyridine in the environment. *CRC Crit. Rev. Environ. Contam.* 19: 309-340.
- Sözen, E., Yılmaz, M., Çolak, G., Yücel, E. 2010. Ecotoxicological effects of alkaline metal salts (H₂SO₄) and some heavy metals (CuCl₂, FeCl₃, MgCl₂ ve ZnCl₂) on the germination of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Biological Diversity and Conservation (BioDiCon)*. 3/3: 64-71.
- Te-Hsiu, M.A. 1999. The International program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*. 426: 103-106.
- Türkoğlu, Ş. 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. L. *Mutation Research*. 626/1-2: 4-14.
- Yücel, E., Hatipoğlu, A., Sözen, E., Güner, Ş.T. 2008. The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of Anatolian Black Pine (*Pinus nigra ssp. pallasiana*). *Biological Diversity and Conservation (BioDiCon)*. 1/2: 124-129.
- Zeytinoglu, H., Meric, A., Tuylu, B., Ergene, E. 2006. Synthesis and genotoxic activities of five 2-aryl-substituted-benzothiazole derivatives. *Revista Chimie*. 57/12: 1247-1252.
- Zimmermann, F.K., Henning, J.H., Scheel, I., Dehler, M. 1986. Genetic and anti-tubulin effects induced by pyridine derivatives. *Mutation Research*. 163: 23-31.

(Received for publication 28 June 2011; The date of publication 15 August 2011)