

Methidathion İnsektisit/Akarisitinin Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin Allium Testi ile İncelenmesi

Fatma Ünal^{1*}, Nesrin Durdu Helvacı Tülek¹, Deniz Yüzbaşıoğlu¹, Mustafa Çelik²
¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06560, Ankara, Türkiye
² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 46100, Kahramanmaraş, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Methidathion'un genotoksik potansiyeli Allium testi ile ilk kez incelenmiştir.
- Methidathion *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde anlamlı sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmuştur.
- Allium testinin, methidathionun toksik etkisini belirlemede hassas ve etkili bir test olduğu gösterilmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş:05/11/2020
Kabul: 22/11/2020

Anahtar Kelimeler

Pestisit,
Methidathion,
Sitotoksik etki,
Genotoksik etki,
Allium cepa

Özet

Organik fosforlu pestisitlerden olan Methidathion (Supracide 40 EC, MET), meyve ağaçlarında, sebzelerde, tütünde, yoncada, ayçiçeğinde, seralarda ve gül bahçelerinde çeşitli böcek ve akarlar karşı kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Allium testi kullanılarak, methidathionun Allium cepa kök ucu hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Kök büyüme inhibisyon testi ile, etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri 30 mg/L olarak tespit edildikten sonra, Allium cepa kök uçları, MET'un dört farklı konsantrasyonu (7,5, 15, 30 ve 45 mg/L) ile 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. MET, mitotik indeksi (MI), tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde, kontrole kıyasla anlamlı şekilde düşürmüştür. Diğer yandan MET, kromozomal anormallikleri, kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. En yaygın görülen anormallikler kromozom yapışıklığı (%47,50) ve C-mitoz (%44,24)'dur. Bunları sırasıyla fragment (%2,75), köprü (%2,55), geri kalma (%1,63) ve çok kutupluluk (%1,33) takip etmiştir. Çalışmada ayrıca, ön işleme tabi tutulmuş kök uçlarında kromozom ve kromatid kırıkları, fragmentler ve poliploidi tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, MET'un Allium cepa'da belirgin şekilde sitotoksik ve genotoksik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Allium testinin, MET'un toksik etkilerini belirlemede çok hassas ve etkili bir test olduğunu doğrulamıştır.

The Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Potential of Methidathion Insecticide/Acaricide by Allium Test

Highlights

- The genotoxic potential of Methidathion was examined for the first time using the Allium test.
- Methidathion exhibited significant cytotoxic and genotoxic effects in root tip cells of *Allium cepa*.
- The Allium test has also been confirmed as a sensitive and effective test for determining the toxic effect of methidathion.

Article Info

Received: 05/11/2020
Accepted: 22/11/2020

Keywords

Pesticide,
Methidathion,
Cytotoxic effect,
Genotoxic effect,
Allium cepa

Abstract

Methidathion (Supracide 40 EC, MET), an organophosphorus pesticide, is used to control various insects/mites in a variety of crops such as fruits, vegetables, alfalfa, sunflower, tobacco, greenhouses, and rose gardens. In this study, cytotoxic and genotoxic potentials of methidathion were investigated in *Allium cepa* root meristem cells using the Allium test. Firstly, the EC₅₀ value of methidathion was detected as 30 mg/L using root growth inhibition test and then four concentrations, 7.5, 15, 30, and 45 mg/L, were applied to *Allium cepa* for 12, 24, and 48 hours. MET significantly decreased the mitotic index (MI) in all the concentrations and treatment periods compared to the control. On the other hand, MET significantly increased the frequency of chromosome aberrations compared to control groups. The most common types of abnormalities recorded were stickiness (47.50%) and C-mitosis (44.24%). They were followed by fragment (2.75%), bridge (2.55%), laggards (1.63%), and multipolarity (1.33%), respectively. Besides, in pretreated root tips, chromosome and chromatid breaks, fragments, and polyploidy were detected. The results of this study revealed that MET has significant cytotoxic and genotoxic effects in *Allium cepa*. It has also confirmed that the Allium test is a very sensitive and effective assay in determining the toxic effects of MET.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılın başından beri giderek artış gösteren dünya nüfusunun, 2050 yılına kadar 9,4-10 milyar civarında olacağı tahmin edilmektedir [1, 2]. Dünya nüfusundeki bu artış, gıdaya ve tarımsal üretime olan ihtiyacı da ciddi şekilde artırmaktadır. Ancak tarım amacıyla kullanılan alanların sınırlı olması ve hatta giderek küçülmesi nedeniyle, bu ihtiyacın karşılanabilmesi için, birim alandan elde edilen verimin arttırılması yoluna gidilmektedir. Verimin arttırılabilmesi için de pestisit veya bitki koruma kimyasalları olarak bilinen ve doğaya yabancı olan kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bütün bunlardan dolayı, dünya çapında, 1950'lerde 0,2 milyon ton olan pestisit üretimi, 2000 yılına kadar yılda yaklaşık % 11 oranında artarak, 5 milyon tonun üzerine çıkmıştır [3]. 2000 yılından 2017 yılına kadar geçen sürede ise %7'lik bir artış olmuştur [4].

Pestisitler, birbiri ardına geliştirilen ve organoklorin, organofosfat, karbamat, piretroidler, büyüme düzenleyicileri, neonicotinoidler ve biyopestisitler gibi çeşitli bileşik gruplarını içermekte ve bunlara göre adlandırılmaktadır [2]. Pestisitler, etkiledikleri zararlı gruplarına göre de insektisit (böcek öldüren), akarisit (akarları-örümcekleri öldüren), herbisit (yabancı otları öldüren) vb. şekillerde adlandırılmaktadır. Pestisitler, tarım, sanayi ve sağlık alanlarında çeşitli faydalar sağlamakla birlikte, çevreye ve canlılara verebilecekleri zararlar nedeniyle hem toplumda ve hem de bilim insanlarında endişe oluşturmaktadır. Bu nedenle bir çok araştırmaya konu olmuşlardır [2, 5, 6].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2019 yılı verileri ışığında, pestisitleri tehlikelerine göre sınıflandırma kılavuzu yayınlamıştır. Bu kılavuzda pestisitler dört gruba ayrılmıştır. Çok tehlikeli pestisit aktif maddeler Sınıf Ia, oldukça tehlikeli olanlar Ib, orta derecede tehlikeli olanlar Sınıf II ve hafif tehlikeli olanlar Sınıf III olarak gruplandırılmıştır [7]. Methidathion (MET) organik fosforlu bir insektisit/akarisit olup, oldukça tehlikeli aktif maddelerin bulunduğu Ib sınıfında yer almaktadır [7]. Organik fosforlu insektisitler böceklerin sinir sistemini etkilemektedir. Sinyal iletiminde görev yapan asetilkolinin hidrolizinde rol oynayan asetilkolinesteraz enziminin işlevini engeller. Böylece sinyal iletimi durur ve ölüm gerçekleşir [8, 9]. Bu grupta yer alan bileşiklerin ve yan ürünlerinin diğer bir önemli özelliği de DNA'da alkillenmeye sebep olmaları [10, 11] ve sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler ortaya çıkarabilmeleridir. Organik fosforlu pestisitlerin farklı canlılarda kromozomal anormalliklere, mutasyonlara ve DNA hasarına neden olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [12-15].

MET, organik fosforlu bileşiklerin heterosiklik türevleri grubundandır. Meyve ağaçlarında (şeftali, armut, elma, dut, incir vb.), sebzelerde, tütünde, yoncada, ayçiçeğinde, seralarda ve gül bahçelerinde çok çeşitli böcek ve akarlar karşı kullanılmaktadır. Ülkemizde 2011 yılında kullanımdan kaldırılmış [16] olmakla birlikte, yurt dışı menşeli çeşitli sitelerde ürün satışı yapılmakta ve dolayısıyla kullanımı da devam etmektedir. LD₅₀ değerleri sıçanlar için 25 ila 48 mg/kg ve fareler için 25 ila 70 m/kg arasında değişmektedir [17]. MET'nun genotoksik potansiyele sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla Stivaktakis ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada [18], MET'un düşük konsantrasyonlarının etkisi kültürdeki insan lenfositlerinde incelenmiştir. Buna paralel olarak, farklı alkalın pH değerlerinin neden olduğu genotoksik aktivitesi de değerlendirilmiştir. Bu amaçla *in vitro* mikronukleus (MN) testi kullanılmıştır. İncelenen tüm konsantrasyonlarda MET'un mikronukleus frekanslarını artırmadığı ve genotoksik olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Lodovici ve arkadaşları [19], MET'un sıçanların karaciğerinde DNA hasarı oluşturmadığını açıklamışlardır. 1996 yılında fare kemik iliğinde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada MET'un MN frekansını artırmadığı bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada MET'un insan lenfositlerinde metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda kardeş kromatid değişimlerini artırdığı belirlenmiştir [20]. 2014 yılında yapılan ve MET'un oldukça düşük dozlarının (0,01-0,075 mg/L) kullanıldığı bir çalışmada, *Drosophila*'da *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testinde genotoksositeye neden olmadığı tespit edilmiştir [21]. Dişi Wistar ratlarda kemik iliğinde *in vivo* MN testi kullanılarak yapılan bir araştırmada, MET'nun intraperitoneal uygulamasının MN frekansını artırmadığı ancak nekrotik ve apoptotik hücre oranını doza bağlı olarak anlamlı düzeyde artırdığı açıklanmıştır. Bu nedenle MET'un insanlar için güvenli olmadığı vurgulanmıştır [22]. MET'un *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir araştırmada, bu pestisit kromozomal anormallik (KA) ve mikronukleus frekansını ve kardeş kromatid değişimi (KKD)/ oranını anlamlı düzeyde

artırdığı, diğer yandan mitotik indeksi anlamlı şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında MET'un klastojenik, mutajenik ve anöjenik etkilere neden olduğu belirtilmiştir [23]. Bu yayınlar, MET'nun genetik materyal ile etkileşime girebileceğini, DNA'da ve kromozomlarda değişimlere ve hasarlara sebep olabileceğini ve sonuçta genotoksik ve mutajenik olabileceğini göstermektedir. Bu da MET'nun insanlarda sağlık sorunlarına ve hatta kansere dahi neden olabileceğine işaret etmektedir.

Çevresel kirleticilerin genotoksik, mutajenik ve kanserojen etkilerinin belirlenmesinde çeşitli testler ve bu testlerde farklı türler kullanılmaktadır. Genellikle *Allium cepa*'nın kullanıldığı *Allium* testi de mükemmel bir genetik model ve biyogösterge olarak uzun yıllardır bilim insanları tarafından tercih edilen bir testtir. İlk defa 1938 yılında Levan tarafından kolşisinin etkisini belirlemek amacıyla uygulanan bu test, 1985 yılında Fiskeşjö tarafından standart bir test haline getirilmiş ve daha sonra 2003 yılında Rank tarafından bazı değişiklikler yapılarak geliştirilmiştir [24]. Bu test, Birleşmiş Milletler Çevre Programı (United Nations Environment Program-UNEP), Bitki Biyotestlerinde Uluslararası Program (International Program on Plant Bioassays-IPPB) [25] ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı, Genetik Toksikoloji Programı (US Environmental Protection Agency-EPA, Gene-Tox Program) [26] tarafından da standardize edilerek önerilen testlerden biridir. Bu biyotestlerden elde edilen verilerin, çevresel genotoksisiteyi belirlemede etkili olduğu USEPA ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) tarafından da kabul edilmektedir [27].

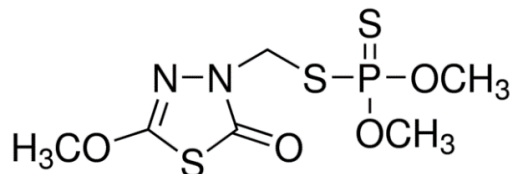
Gelişmiş bir organizma olan bitkilerin genotoksisite testinde kullanımı, çok hücreli bir sistemde çeşitli kimyasalların potansiyel DNA hasarı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bitkilerin kullanımı, ekzojen metabolik sistemler gerektirmediği için büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, deneysel çalışmalarda hayvanların kullanımına kıyasla, hem daha az maliyetli ve hem de etik kaygılardan uzak bir rahatlık oluşturmaktadır [24, 28-31]. Bütün bunlara ilaveten, *Allium* testi ile elde edilen sonuçların, çeşitli hücreler ile yapılan *in vitro* çalışmalarla ve farklı hayvanların kullanıldığı *in vivo* çalışmalarla benzer sonuçlar verdiği de belirlenmiştir [24, 30]. *Allium cepa*, hem az sayıda kromozoma sahip olması ($2n=16$) ve hem de kromozomlarının büyük ve ışık mikroskopunda incelenmesinin kolay olması gibi avantajları nedeniyle *Allium* testinde en çok tercih edilen türdür [24, 32-35]. *Allium* testinde ayrıca *Allium sativum*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia paludose* ve *Hordeum vulgare* gibi başka türler de kullanılmaktadır [30, 36].

Yukarıda kısaca özetlenen araştırmalar, bir yandan MET'nun toksik olabileceğine yönelik bulguların olduğunu diğer yandan çevresel kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *Allium cepa*'nın önemli bir biyogösterge olduğunu göstermektedir. Ayrıca, MET'nun genotoksik potansiyelinin *Allium cepa* kök ucu hücreleri gibi önemli bir biyogösterge türünde incelendiğine yönelik bir araştırma mevcut değildir. Bütün bu sebeplerden dolayı, bu araştırmanın amacı, MET (Supracide 40 EC)'un toksik etkilerini *Allium* testi kullanarak *Allium cepa* kök ucu meristeminde incelemektir. Bu test ile hem MET'nun mitoz bölünme üzerindeki etkisi (mitotik indeks) ve dolayısıyla sitotoksik potansiyeli ve hem de mitozda anormallik oluşturma ve dolayısıyla klastojenik ve anöjenik (genotoksisitenin) potansiyeli ortaya çıkarılabilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Test Maddesi

Bu çalışmada, organofosforlu insektisit/akarisit olan Supracide 40 EC (426 gr/L methidathion) kullanılmıştır. MET'un kimyasal formülü $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$ olup katalog numarası 950-37-8'dir. Molekül ağırlığı 302,3 g/mol'dür. Kimyasal adlandırması S-[(5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-yl)methyl]0,0-dimethyl phosphorodithioate şeklindedir. Yapısal formülü Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Methidathion'un yapısal formülü [37]

2.2. Test Materyali

Bu araştırmada *Allium cepa* testi uygulanmıştır. Bunun için birbirine yakın büyüklükte (1,5-2,0 cm çapında) *Allium cepa* L. (2n=16) yumruları seçilmiş ve kurumuş kabukları ve kökleri temizlenerek kullanılmıştır.

2.3. EC₅₀ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Öncelikle, MET'un EC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, büyüme inhibisyon testi uygulanmıştır [38-40]. Bunun için, soğanlar dört gün boyunca MET'un 13 farklı konsantrasyonu (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ve 250 mg/L, etken madde miktarı temel alınarak) ile muamele edilmiştir. Her konsantrasyon için 5 farklı soğan kullanılmış ve her soğanda 10 farklı kökün uzunluğu ölçülmüştür. Ayrıca MET'un eklenmediği bir kontrol grubu da oluşturulmuştur. Uygulama sonucunda, kontrol grubundaki ortalama kök uzunluğuna kıyasla %50 oranında kısalma sağlayan konsantrasyonun, yani EC₅₀ değerinin 30 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

2.4. Test Konsantrasyonları ve Muameleler

EC₅₀ konsantrasyonu belirlendikten sonra, en yüksek konsantrasyon olarak EC₅₀x3/2 değerleri de EC₅₀x1, EC₅₀x1/2 ve EC₅₀x1/4 olacak şekilde dört konsantrasyon (45, 30, 15 ve 7,5 mg/L) belirlenmiştir. Soğanlar önce 24 saat oda sıcaklığında (20±1°C) distile suda çimlendirilmiştir. Çimlenen soğanlar, MET'nun 4 farklı konsantrasyonu ile 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Kontrol grubundaki soğanlar sadece distile suda bekletilmiştir. Tüm uygulama sürelerinde, her bir konsantrasyon için 12 soğan kullanılmıştır. Uygulamalardan sonra kök uçları alınarak, damıtık su ile yıkanmış ve 24 saat boyunca 3:1 etil alkol:glasiyal asetik asit ile tespit edilmiştir. Takiben kökler %70'lik alkole aktarılmış ve kullanılabildiği kadar buzdolabında saklanmıştır [41, 42]. Özellikle metafaz aşamasındaki anormalliklerin tespiti için köklerin bir kısmı tespit işleminden önce α -monobromonaftalin ile 3 saat muamele edilmiştir [43, 44]. Sitolojik preparatlar, 10 farklı soğandan elde edilen kök uçlarından, Feulgen metodu kullanılarak hazırlanmış ve depex ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

2.5. Mitotik İndeks, Mitotik ve Kromozomal Anormallik Testi

Her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için farklı soğanların kök uçlarından hazırlanmış 10 farklı preparatta mitotik indeks, mitotik safhaların oranları ve mitotik anormallikler incelenmiştir. Her bir preparatta 1000 hücre, 10 farklı kök ucundan toplam 10.000 hücre değerlendirilmiştir. Ayrıca ön muamele yapılan kök uçlarında metafazdaki anormalliklerin tespitinde her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için beş farklı soğan kullanılmış olup, her soğandan 100 hücre (toplam 500 hücre) incelenmiştir.

2.6. İstatistiksel Analiz

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında, mitotik indekste z-testi, mitotik faz oranları, mitotik ve kromozomal anormalliklerde ise χ^2 testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

MET'in *Allium cepa* kök uçlarına uygulanan tüm konsantrasyonları ve uygulama süreleri, mitotik indeksi kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşürmüştür. Diğer taraftan metafaz ve telofaz safhalarında bir miktar artışa ve profaz safhasında da bir miktar azalmaya neden olmuştur. Ancak mitotik safhaların oranları üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır (*Çizelge 1*).

Çizelge 1. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök uçlarında mitotik indeks ve mitotik fazların frekansı

Konsantrasyonlar (mg/L) ve muamele süreleri	Bölünen hücre sayısı	M \bar{X} ±SH	Mitotik fazlar (%)			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol	823	8,23± 0,30	50,55	25,27	12,65	11,54
12 saat						
7,5	645	6,45±0,24 ^a	38,00	33,88	11,34	16,78
15	366	3,66±0,19 ^a	46,99	28,69	10,66	13,66
30	439	4,39±0,20 ^a	46,70	30,98	9,79	12,53
45	278	2,78±0,16 ^a	37,05	35,61	10,43	16,91
24 saat						
7,5	635	6,35±0,24 ^a	37,48	28,50	14,49	19,53
15	386	3,86±0,19 ^a	41,71	35,23	7,00	16,06
30	365	3,65±0,19 ^a	43,84	30,14	12,60	13,42
45	409	4,09±0,20 ^a	45,23	26,41	13,20	15,16
48 saat						
7,5	596	5,96±0,24 ^a	35,74	33,55	12,58	18,12
15	632	6,32±0,24 ^a	35,76	31,80	14,24	18,20
30	426	4,26±0,20 ^a	39,20	31,93	11,97	16,90
45	443	4,43±0,15 ^a	43,57	33,86	10,38	12,19

^aKontrolle göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

MET uygulaması *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik anormalliklerde artışa neden olmuştur (Çizelge 2). Mitotik anormallik düzeyi, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarda (12 saatlik uygulamanın en düşük konsantrasyonu hariç) kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Yapışık kromozom, C-mitoz, köprü, fragment, geri kalma ve çok kutupluluk olmak üzere altı farklı mitotik anormallik gözlenmiştir (Şekil 2). En yaygın görülen anormallik tipi yapıışık kromozomlardır (%47,50). İkinci en sık görülen anormallik ise C-mitoz olup görülme frekansı %44,24'dür. Bunu sırasıyla fragment (%2,75), köprü (%2,55), geri kalma (%1,63) ve çok kutupluluk (%1,33) takip etmektedir. Diğer taraftan interfazda çok çekirdekli ve mikroçekirdekli hücreler gözlenmiştir. Ancak interfazda gözlenen anormallik düzeyi kontrole kıyasla anlamlı değildir (Çizelge 2).

MET uygulaması sonucunda ortaya çıkan ve α - monobromonaftalin ile ön muamele edilerek tespit edilen bazı kromozomal anormallikler Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu anormalliklerin oranı kontrol grubuna kıyasla sadece 12 ve 48 saatlik uygulamaların 7,5 mg/L'lik konsantrasyonunda, 24 saatlik uygulamanın ise 15 mg/L'lik konsantrasyonunda anlamlıdır (Çizelge 3). En fazla gözlenen anormallikler kromozom kırıkları olup (%47,73) daha sonra fragment (%30,68) ve sayısal anormallik olan poliploidi (%18,18) gelmektedir. Ayrıca düşük oranda (%3,41) kromatit kırıkları da belirlenmiştir.

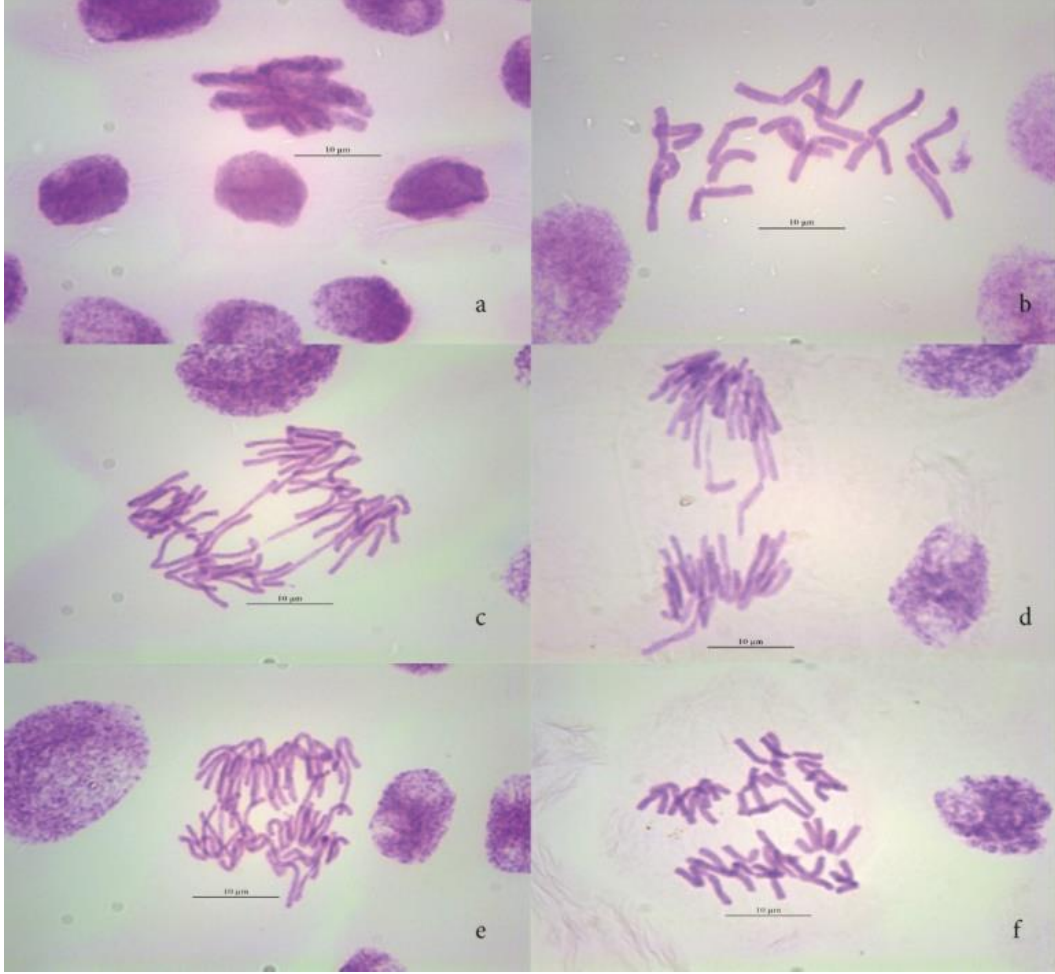
Çizelge 2. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök uçlarında mitotik anormallik tipleri ve frekansları

Kons. (mg/L) ve muam. süresi	Mitotik-kromozomal anormallikler (%)						Toplam anormallik (%)	Anormal interfaz		
	Yapışıklık	C-mitoz	Fragment	Köprü	Geri kalma	Çok kutupluluk		Çoklu çekirdek	Mikro-çekirdek	Anormal interfaz (%)
Kontrol	1,34	-	-	-	-	0,12	1,46	0,05	-	0,05
12saat										
7,5	0,62	1,24	1,09	0,47	0,31	0,31	4,04	0,88	0,01	0,89
15	9,84	6,56	-	1,09	-	-	17,49***	0,33	-	0,33
30	1,82	13,90	-	0,46	0,46	-	16,64***	-	0,04	0,04
45	6,47	16,91	-	1,80	1,08	0,36	27,34***	-	0,02	0,02
24 saat										
7,5	12,28	2,68	1,42	0,31	-	0,16	16,85***	0,98	0,05	1,03
15	10,36	11,66	-	0,52	-	0,26	22,80***	0,65	0,01	0,66
30	4,38	9,85	-	-	0,82	-	15,05***	-	0,01	0,01
45	10,51	3,42	-	0,24	0,49	0,24	14,90***	-	0,03	0,03
48 saat										
7,5	12,58	8,05	1,34	0,34	-	-	22,31***	0,65	0,09	0,74
15	5,22	2,53	-	0,63	-	0,47	8,85*	0,34	-	0,34
30	6,34	8,91	-	-	0,47	0,47	16,19***	-	-	-
45	19,86	18,07	0,68	-	-	0,45	39,06***	1,10	0,16	1,26
Anormallik frekansları (%)	47,50	44,24	2,75	2,55	1,63	1,33				

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) **Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)**Çizelge 3.** Methidathion ile muamele edilen ve α -monobromonaftalin ile ön işlem uygulanan *A. cepa* kök uçlarında metafazda gözlenen anormallik tipleri ve oranları

Kons. (mg/L) ve muamele süreleri	Anormallikler (%)				Toplam anormallik %
	Kromozom kırığı	Fragment	Poliploidi	Kromatid kırığı	
Kontrol	2	1	-	-	3
12 saat					
7,5	7	6	-	-	13*
15	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
45	-	1	-	-	1
24 saat					
7,5	5	4	-	-	9
15	7	2	14	-	23***
30	2	1	-	-	3
45	3	3	-	-	6
48 saat					
7,5	9	2	2	3	16**
15	2	3	-	-	5
30	2	2	-	-	4
45	5	3	-	-	8
Anormallik frekansları (%)	47,73	30,68	18,18	3,41	

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) **Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) ***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)



Şekil 2. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik ve kromozomal anormallikler a)Yapışık kromozomlar b)C-mitoz c)Köprü d) Geri kalma e-f)Çok kutupluluk

4. TARTIŞMA

Pestisitler hem tarım alanlarında hem ticari alanlarda ve hem de insanların yerleşim yerlerinde kullanılan ve bütün popülasyonun çeşitli yollar ile maruz kaldığı kimyasal maddelerdir. İncelenen bazı popülasyonlarda, bireylerin büyük kısmının idrarında, çeşitli pestisitlerin metabolitleri tespit edilmiştir. Bu durum, bu popülasyonların özellikle pestisitler ile muamele edilmiş gıdaları tüketmesiyle veya diğer yollarla pestisitleri vücutlarına aldığını göstermektedir [45, 46]. Son 20 yılda yapılan araştırmalarda, pestisitlere maruz kalma ile bazı kanser türleri arasında bir bağlantı olduğu da tespit edilmiştir. Hematopoietik sistemin maligniteleri olan lösemi ve lenfoma ile beyin tümörleri, prostat kanseri, meme kanseri, pankreas kanseri ve akciğer kanseri en sık rastlanan kanser tipleridir [6, 47-49]. Epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra, pestisitlerin karsinogenitesine aracılık eden mekanizmaları araştıran deneysel çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Kimyasal kanserojenlerin genetik veya epigenetik mekanizmalarla hücre döngüsünü kontrol eden genlerde neden olduğu değişiklikler, kanserin indüklenmesine neden olabilir. DNA ya da kromozom seviyesindeki genetik hasarlar, kanserojenitenin olası mekanizmaları olarak kabul edildiğinden, pestisitlerin genotoksitesine ilişkin çalışmalar, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır [50, 51]. Genetik toksisiteye ek olarak, pestisitlerin oksidatif strese neden olabileceği ve endokrin bozucu olarak davranabilecekleri, DNA ve diğer makromoleküllere zarar vererek gen ekspresyonunu etkileyebilecekleri belirlenmiştir. Bu değişiklikler çoğunlukla hücrelere zararlı olmakta ve kanser de dâhil olmak üzere, çoklu bozuklukların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Pestisitlerin epigenetik düzeyde etkilerini inceleyen çalışmalar DNA metilasyon düzeninde, histon modifikasyonunda ve ayrıca kodlayıcı olmayan RNA seviyesinde çok sayıda modülasyona neden

olabileceklerini göstermektedir [52]. Bütün bu olası etkileri nedeniyle, pestisit kullanımı konusundaki endişeler giderek artış göstermektedir.

Bu çalışmada organofosforlu pestisitler grubunda yer alan ve insektisit/akarisit olan MET'un olası etkileri, güvenilen ve sıklıkla tercih edilen bir genotoksisite testi olan *Allium* testi ile *A. cepa* kök ucu hücrelerinde ilk kez incelenmiştir. Bu test kimyasal maddelerin hem sitotoksik ve hem de genotoksik potansiyelini tespit etmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

MET'un *Allium cepa*'da kullanılan bütün konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde mitotik indeksi kontrole kıyasla anlamlı derece düşürmüş olması güçlü sitotoksik potansiyelini göstermektedir. MI'te gözlenen düşüşler, kromozom anormalliği frekansındaki artış ile ters yönlü bir bağıntı göstermiştir. MET, profaz safhasında bir miktar düşüşe ve metafaz ve telofazda bir miktar artışa neden olsa da gözlenen değerler kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada gözlenen güçlü sitotoksik etki, organofosfor grubundan olan farklı pestisitlerin *Allium* testinde mitotik indekste düşüşe ve mitoz bölünmenin inhibisyonuna neden olduğu çalışmalara benzerlik göstermektedir [12, 53-57]. Mitotik indekste gözlenen inhibisyonun, G₁ fazında hücre bölünmesinin durdurulmasından ya da uzamış bir G₂ periyodundan kaynaklanabileceği açıklanmıştır. Mitotik indekste düşüş, S-fazında DNA sentezinin inhibisyonundan da kaynaklanmış olabilir [55, 58]. Pestisitlerin etkisine bağlı olarak ortaya çıkan metabolik bozukluklar genellikle hücre bölünmesinin durdurulmasına sebep olmakta, bu da DNA, RNA, protein ve enerji sentezini etkilemektedir [41, 59-62].

MET, uygulanan bütün konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde (7,5 mg/L, 12 saat hariç), kromozomal anormalliklerin frekansını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. MET, *Allium cepa* kök uçlarında yapışıklık, C-mitoz, köprü, fragment, geri kalma ve çok kutupluluk gibi anormalliklere neden olmuştur. Ayrıca anlamlı düzeyde olmamakla birlikte interfazda çok çekirdekli ve mikroçekirdekli hücreler de oluşturmuştur. Farklı organofosfat pestisitlerinin genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalarda da bu pestisitlerin kromozomal anormalliklerin frekansını artırdıkları yönünde sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin malathion, bu çalışma sonuçlarında olduğu gibi, *A. cepa* kök ucu hücrelerinde anormallik oranını artırmış ve kromozom kırığı, yapışıklık, geri kalma ve köprü gibi mitotik anormalliklere neden olmuştur [57]. Afugan fungusinin de *Allium* testinde çeşitli anormalliklere sebep olduğu açıklanmış ve yapışıklık, C-mitoz, köprü, geri kalma ve fragment gibi anormallikler rapor edilmiştir [53]. İki farklı organofosfatlı pestisit olan monocrotophos (MCP) ve chlorpyrifos (CPF)'un artan konsantrasyonları ile geri kalma, yapışıklık, köprüler, binükleat hücreler, mikronükleus ve fragmentler gibi anormalliklerin arttığı, mitotik indeksin ise anlamlı ölçüde düştüğü belirlenmiştir [55].

MET'un en fazla neden olduğu anormallik kromozom yapışıklığıdır (%47,50). Yapışkan kromozomların organofosfatlı pestisitlerin neden olduğu en baskın tip anormallik olduğu bildirilmiştir (Sinha ve Kumar, 2014). Elektron mikroskopunda yapılan çalışmalar kromozom yapışıklığının kromatid tipi bir anormallik olduğunu göstermiştir [63]. Diğer yandan, Patil ve Bhat (1992) [64] yapışkanlığın kromatin materyalinin protein içeren matrisindeki bir tür fiziksel adezyon olduğunu bildirmiştir. Yapışkanlığın, kromozomlar arasında subkromatik bağlantılara yol açan kromatin ipliklerinin bozulmasının bir sonucu olduğu da vurgulanmıştır. Bazı klastojenlerin, DNA'ya doğrudan etkili olmadığı, kromozom yapışıklığı oluşturmak suretiyle, dolaylı şekilde etkili olduğu belirtilmiştir [66]. Kromozom yapışıklığına neden olan kimyasalların sitotoksik olduğu, bu hasarın geri döndürülemez ve sonuçta hücre ölümüne neden olduğu açıklanmıştır [38, 67]. MET'un yaygın olarak ortaya çıkardığı diğer anormallik ise C-mitozdur (%44,24). C-mitoz, kullanılan kimyasalın disülfid bağlarını bozmak suretiyle güçlü bir iğ inhibitörü olarak davrandığını göstermektedir [66]. Diğer yandan, eğer hücrede iğler kısmen etkilenmişse, çok kutuplu anafaz veya geri kalmış kromozomlar gözlenir. Bu durum, mikronükleus oluşumu ile sonuçlanır. Bu mikronükleuslarla beraber hücreden genetik materyal kaybı gerçekleşeceğinden, hücreye ciddi etkileri olacaktır [67]. Ahmad ve Yasmin (1992) [68], mikronükleusların, geri kalmış kromozomlardan veya mitotik aşamada gözlenen fragmentlerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Fragmentler kromozomlarda ortaya çıkan kromatid ya da kromozom kırıklarının yapısal sonuçlarıdır. Bu çalışmada, methidathion, *A. cepa*'da hem anöjenik (iğ ipliği üzerinde) hem de klastojenik (DNA üzerinde) etkiye işaret eden çok kutupluluk, geri kalmalar ve

fragmentler oluşturmuştur. Anafaz ve telofazdaki kromozomal köprü oluşumu, kromozomların metafaz aşamasındaki genel yapışkanlığından veya kromozomların kırılması ve yeniden birleşmesinden kaynaklanabilmektedir [41, 69]. Köprü ve fragmentler, kromatid kırıklarından da kaynaklanabilir. Bu oluşumlar, klastojenik etkinin göstergesidir [66]. MCP ve CPF pestisitlerinin *Allium* testi ile genotoksik potansiyelinin incelendiği çalışmada kromozomal anormalliklerin sıklığının sırasıyla yapışıklık>fragment>köprü>geri kalma>binükleat>mikronukleus şeklinde olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, MCP'nin CPF'tan daha etkili olduğu belirtilmiştir [55]. Genotoksik hasarlar, kullanılan kimyasalın DNA tamir sitemini direkt veya indirekt yollarla engellemesinden örneğin DNA polimerazın fonksiyonu için gerekli belirli iyonların engellenmesinden de kaynaklanabilir [66].

Bu çalışmada ayrıca MET'un metafaz evresindeki kromozomlar üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, α -monobromonafalin ile ön muamele edilmiş kök uçları da incelenmiştir. MET'un metafazda neden olduğu kromozomal anormallik oranı yalnızca 12 ve 48 saatlik uygulamaların 7,5 mg/L'lik konsantrasyonunda, 24 saatlik uygulamanın ise 15 mg/L'lik konsantrasyonunda anlamlı düzeydedir. Diğer konsantrasyonlarda kromozomal anormallik oranının istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni, bu pestisidin mitotik indeksi azaltacak şekilde etkili olmasıyla açıklanabilir. Bu uygulamada, kromozom kırıkları en sık gözlenen anormallik olup bunu fragment ve poliploidi izlemektedir. Daha düşük oranda kromatid kırıkları da gözlenmiştir. Bu bulgular yine MET'un klastojenik ve anöjenik etkili olduğunu desteklemektedir. Kromozom kırılmasına neden olan kimyasalların, kromozomlar üzerinde ve dolayısıyla DNA üzerinde bir etki oluşturarak klastojenik etkiye neden oldukları bilinmektedir [70]. Poliploidi, iğ ipliklerinin etkilendiğini göstermekte ve anöjenik etkili olduğunu düşündürmektedir. Kromozomal anormallikler, mutasyonun güvenilir göstergeleri olarak kabul edilmekte ve mutasyonel aktiviteyi taramak için güvenilir bir kanıt olarak kullanılmaktadır [55, 71].

MET'un genotoksik potansiyelinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Fare kemik iliğinde MN testinin (25 ve 27,5 mg/kg vücut ağırlığı), insan lenfosit kültüründe ise kardeş kromatid değişimi testinin (1, 10 ve 100 μ mol/L) uygulandığı bir çalışmada, MET'un genotoksik etkileri metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. MET'un, fare kemik iliğinde MN frekansını artırmadığı, insan lenfositlerinde ise metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda KKD sayısını artırdığı belirlenmiştir [20]. Diğer bir çalışmada, MET'un 135, 270 ve 405 mg/kg'lık konsantrasyonları, dişi Wistar ratlara 30 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanmış ve genotoksik potansiyeli kemik iliğinde MN testi ile incelenmiştir. MET'un MN frekansını artırmadığı ancak nekrotik ve apoptotik hücre düzeyini doza bağlı olarak anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle MET'un insanlar için güvenli olmadığı vurgulanmıştır [22].

MET'un 1 ila 3 μ g/mL'lik düşük konsantrasyonlarının genotoksik etkisi, insan lenfosit kültüründe, mikronukleus testi kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, farklı alkalik pH değerlerinde (pH 9,5 ve 12) MET'un neden olduğu genotoksik etki de değerlendirilmiştir. pH 7,4'te test edilen tüm konsantrasyonlarda, MET'un mikronukleus frekanslarını artırmadığı ve genotoksik olmadığı bildirilmiştir. Ancak en yüksek konsantrasyonda (3 μ g/mL), pH 10'dan itibaren MN frekanslarında artış ortaya çıkmış ve pH 11'de bu artış anlamlı düzeye ulaşmıştır. Methidathionun alkalik hidrolizinin, iki yeni molekül oluşumuyla sonuçlandığı, bunlardan birinin elektroaktif olmayan fosfono-bileşik ve diğerinin oldukça elektroaktif bir sülfhidril türü olduğu açıklanmıştır. İkinci molekülün, insan lenfosit kültüründe orijinal molekülden daha genotoksik olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, yüksek pH değerlerindeki alkali ortamın, orijinal ortamdaki çok daha genotoksik moleküller üretebileceğini de belirtmişlerdir [18].

Ünal ve arkadaşları [23], MET'un kültürdeki insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerini kromozomal anormallik, mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi testleri ile incelemiştir. Lenfositler 24 ve 48 saat boyunca MET'un dört farklı konsantrasyonu (3,75, 7,5, 15 ve 30 μ g/mL) ile muamele edilmiştir. MET'un mitotik indeksi düşürdüğü, anormal hücre oranını, KKD ve MN frekansını anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir. En sık görülen kromozomal anormalliklerin kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozomlar ve kromatid kırıkları olduğu açıklanmıştır. Araştırmacılar verilerine dayanarak, MET'un klastojenik, mutajenik ve anöjenik etkilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, adı geçen çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak bu araştırma, *Allium* testinin çevresel kirleticilerin sitotoksik ve genotoksik etkisini belirlemede hassas ve başarılı bir test olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ayrıca, methidathionun, *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde hem mitoz bölünmeyi önemli ölçüde düşürdüğü/engellediği ve hem de mitoz sırasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde anormallikler oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu kimyasalın insektisit/akarisit olarak kullanılması esnasında, diğer bazı pestisitlerde de olduğu gibi, hedef olmayan organizmalarda ve sonuçta insanlarda sitotoksik ve genotoksik etkileri olabileceği unutulmamalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] UN. 2015. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241. United Nations New York, 2015.
- [2] Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60.
- [3] İnternet 1: FAO. 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Son Erişim Tarihi: 02. 07. 2020).
- [4] İnternet 2: FAO. 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Son Erişim Tarihi: 02. 07. 2020).
- [5] Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Sancak C. (2009). Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology*, 33, 283-290.
- [6] Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599.
- [7] World Health Organization. (2020). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019. *World Health Organization*.
- [8] Ünal, G. ve Gürkan, M. O. (2001). *İnsektisitler, Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara, 159.
- [9] Singh, K. D., Labala, R. K., Devi, T. B., Singh, N. I., Chanu, H. D., Sougrakpam, S., and Rajashekar, Y. (2017). Biochemical efficacy, molecular docking and inhibitory effect of 2, 3-dimethylmaleic anhydride on insect acetylcholinesterase. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- [10] Bedford, C. T. and Robinson, J. (1972). The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica*, 2(4), 307-337.
- [11] Wooder, M. F. and Wright, A. S. (1981). Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 49, 51-55.
- [12] Timoroğlu, İ., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz S., Aksoy H., and Çelik M. (2014). Assessment of genotoxic effects of organophosphorus insecticides phorate and trichlorfon in human lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 29, 577-587.
- [13] Ezzi, L., Salah, I. B., Haouas, Z., Sakly, A., Grissa, I., Chakroun, S., and Cheikh, H. B. (2016). Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4859-4867.
- [14] Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Risueño, M. C., and Testillano, P. S. (2018). The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environmental Pollution*, 240, 77-86.
- [15] Yahia, D. and Ali, M. F. (2019). Cytogenetic and genotoxic effects of penconazole and chlorpyrifos pesticides in bone marrow of rats. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 9(2), 29-38.
- [16] İnternet:<https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitki-Sagligi-Hizmetleri/Bitki-Koruma-Urunleri-Ve-Makinalari/Bitki-Koruma-Urunleri> (Yasaklanan Bitki Koruma Ürünleri Aktif Madde Listesi) (Son Erişim Tarihi: 19.10.2020).
- [17] Ukai, S. and Kakuta, N. (1992). *Standard Methods of Chemical Analysis in Poisoning With Commentary*. Pharmaceutical Society of Japan, 4th ed. Nanzandou Co., Tokyo.
- [18] Stivaktakis, P. D., Giannakopoulos, E., Vlastos, D., and Matthopoulos, D. P. (2017). Determination of genotoxic effects of methidathion alkaline hydrolysis in human lymphocytes using the micronucleus assay and square-wave voltammetry. *Bioelectrochemistry*, 113, 9-14.
- [19] Lodovici, M., Casalini, C., Briani, C., and Dolara, P. (1997). Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology*, 117, 55-60.
- [20] Kevekordes, S., Gebel, T., Pav K., Edenharder, R., and Dunkelberg, H. (1996). Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in sister-chromatid exchange test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology Letters*, 89, 35-42.

- [21] Karabulut A. K. and Yeşilada E. (2014). Genotoxicity testing of tributyltin and methidathion in *Drosophila melanogaster* using the wing somatic mutation and recombination test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23, 3475-3480.
- [22] Alshehri, M. A. (2014). Cytogenetic effects of methidathion pesticide on rat bone marrow cells. *Environmental Research Journal*, 8(2), 48-54.
- [23] Ünal, F., Demir, H., and Yüzbaşıoğlu, D. (2017). Genotoxic effects of environmental contaminant methidathion and triadimenol pesticides. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 05-08 July 2017, Minsk-Belarus.
- [24] Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D., and Schiff, S. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3), 191-209.
- [25] Ma, T. H. (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.
- [26] Ma, T. H., Cabrera, G. L., and Owens E. (2005). Genotoxic agents detected by plant bioassays. *Reviews on Environmental Health*, 20(1), 1-14.
- [27] Palmieri, M. J., Andrade-Vieira, L. F., Trento, M. V. C., Eleutério, M. W. F., Lubber, J., Davide, L. C., et al. (2016). Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water Air and Soil Pollution*, 227,156.
- [28] Vicentini, V. E. P., Camparoto, M. L., Teixeira, R. O., and Mantovani, M. S. (2001). *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*, 23(2), 593-598.
- [29] Teixeira, R. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S., and Vicentini, V. E. P. (2003). Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 551-555.
- [30] Tedesco, S. B. and Laughinghouse, I. V. H. D. (2012). Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* test. In: Srivastava J, editor. Environmental Contamination. *Croatia: InTech*, 137-156.
- [31] Özkul M., Özel Ç.A., Yüzbaşıoğlu D., and Ünal F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology*, 68, 2395-2405.
- [32] Doroftei, E., Antofie, M. M., Sava, D., and Arcus, M. (2010). Cytogenetic effects induced by Manganese and Lead micro-elements on germination at *Allium cepa*. *Botanica Serbica*, 34(2), 115-121.
- [33] Bonciu, E. (2012). Cytological effects induced by Agil herbicide to onion. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(1), 68-72.
- [34] Khanna, N. and Sharma, S. (2013). *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: A review. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 2320-9267.
- [35] Sarac, I., Bonciu, E., Butnariu, M., Petrescu, and I., Madosa, E. (2019). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of some heavy metals by use of *Allium* test. *Caryologia*, 72(2), 37-43.
- [36] Leme, D. M. and Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1),71-81.
- [37] İnternet: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/36158?lang=en®ion=TR&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_950-37-8_-_srpRecs3-1 (Son Erişim Tarihi: 21.11.2020).
- [38] Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112.
- [39] Rank, J. and Nielsen, M.H. (1994). Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, 312: 17-24.
- [40] Rank, J. and Nielsen, M.H. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, 418, 113-119.
- [41] El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I., and Mansour, M.M. (2000). 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, 277-287.
- [42] Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H., and Moretton, J. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, 136, 13-18.
- [43] Fiskesjö, G. (1988). The *Allium* test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243-260.
- [44] Kanaya, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S., and Andersson, H.C. (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, 310, 231-247.
- [45] Barr, D. B., Allen R., Olsson A. O., Bravo R., Caltabiano, L. M., Montesano, A., Nguyen, J., Udunka, S., Walden, D., Walker, R.D., Weerasekera, G., Whitehead, R. D. Jr, Schober, S. E., and Needham, L. L. (2005). Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. *Environmental Research*, 99(3), 314-326.
- [46] Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L. Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., and Needham, L. L. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S.

- population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 118, 742-748.
- [47] Lee, W. J., Sandler, D. P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A. J., and Alavanja, M. C. (2007). Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *The International Journal of Cancer*, 121(2), 339-346.
- [48] Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., and Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129-136.
- [49] Luo, D., Zhou, T., Tao, Y., Feng, Y., Shen, X., and Mei, S. (2016). Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Scientific Reports*, 6, 25768.
- [50] Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2012) Current concerns on genotoxicity of pesticides. *International Journal of Pharmacology*, 8, 473-474.
- [51] Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., and Abdollahi, M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Human & Experimental Toxicology*, 24(9), 439-445.
- [52] Sabarwal, A., Kumar, K., and Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.
- [53] Yüzbaşıoğlu, D. (2003). Cytogenetic effects of fungicide afugan on the meristematic cells of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 68(3), 237-243.
- [54] Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53-59.
- [55] Sinha, V. S. and Kumar, N. (2014). Assessment of mito-inhibitory and genotoxic effects of two organophosphate pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L. *Annals of Plant Sciences*, 3, 699-703.
- [56] Pandır, D. (2018). Assesment of the genotoxic effect of the Diazinon on root cells of *Allium cepa* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.
- [57] Sheikh, N., Patowary, H., and Laskar, R. A. (2020). Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. *Molecular & Cellular Toxicology*, 16, 291-299.
- [58] Sudhakar, R., Ninge Gowda, K. N., and Venu, G., (2001). Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cell of *Allium cepa*. *Cytologia*, 66, 235-239.
- [59] Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks. *Cytologia*, 53, 427-436.
- [60] Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P., and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chlorprophan. *Cytobios*, 57(228), 7-14.
- [61] Chauhan, L. K. S., Dikshith, T. S. S., and Sundararaman, V., (1986). Effects of deltamethrin on plant cells I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutation Research*, 171, 25-30.
- [62] Adesuyi, A. A., Njoku, K. L., Ogunyebi, A. L., Dada, E. O., Adedokun, A. H., Jolaoso, A. O., and Akinola, M. O. (2018). Evaluation of the cytogenotoxic effects of emulsifiable concentrate form of amitraz pesticide on *Allium cepa* L. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22(11), 1841-1847.
- [63] Klasterska, I., Natarajan, A. T., and Ramel, C. (1976). An interpretation of the origin of subchromatid aberrations of chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas*, 83, 153-162.
- [64] Patil, B.C. and Bhat, G.I. (1992). A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternata* L. *Cytologia*, 57, 259-264.
- [65] Mc-Gill, M., Pathak, S., and Hsu, T.C., (1974). Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosomes stickiness. *Chromosoma*, 47, 157-167.
- [66] Datta, S., Singh, J., Singh, J., Singh, S., Singh S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 171-178.
- [67] Panda, B.B. and Sahu, U.K. (1985). Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotion. *Cytobios*, 42, 147-155.
- [68] Ahmad, S. and Yasmin, R., (1992). Effects of methyl paration and tri-miltox on the mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 57, 155-160.
- [69] Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., and Erdoğan, S. F. (2015). Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. *Cytotechnology*, 67(5), 783-791.
- [70] Grant, W.F. (1978). Chromosomal aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, 27, 37-43.
- [71] Kihlman, B.A. (1966). *Action of chemicals on dividing cells*. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey.