

4-Metil Umbelliferon'un *Allium* Testi Kullanılarak; Fizyolojik, Sitogenetik, Biyokimyasal ve Anatmik Değerlendirilmesi

Dilek Çavuşoğlu*

¹Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Atabey Meslek Yüksekokulu, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, 32670, Isparta, TÜRKİYE
<https://orcid.org/0000-0002-7963-8204>

*yazışılan yazar: dilekcavusoglu@isparta.edu.tr

(Alınış / Received: 10.12.2022, Kabul / Accepted: 14.04.2023, Yayımlanma / Published: 22.06.2023)

Öz: Bu çalışmada, test materyali olarak *Allium cepa* L. kullanılarak çeşitli fizyolojik, sitogenetik, anatmik ve biyokimyasal parametreler üzerine dışsal 4-metil umbelliferonun (4-MU) doza bağlı etkileri araştırıldı. İncelenen fizyolojik parametreler: çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, kökçük sayısı ve taze ağırlık; sitogenetik parametreler: mikronükleus (MN) sıklığı, kromozom anormalliği (KA) ve mitotik indeks (Mİ); biyokimyasal parametreler: serbest prolin içeriği, malondialdehit (MDA) düzeyi, katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleridir. Soğan kök ucu hücrelerinde meydana gelen yapısal değişimler anatmik kesitler alınarak incelendi. Bu amaçlar için, soğanlar bir kontrol ve üç uygulama olmak üzere dört gruba ayrıldı. 7 gün süresince kontrol grubundaki soğanlar distile su ile muamele edilirken; uygulama gruplarındaki soğanlar 4-MU'nun 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozları ile muamele edildi. 4-MU uygulaması kontrol grubuyla kıyaslandığında fizyolojik parametrelerde bir azalmaya neden oldu. Bu uygulama, KA ve MN sıklığında bir artış ile Mİ'de bir azalma meydana getirdi. Ayrıca, 4-MU muamelesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA ve serbest prolin içeriklerinde de doza bağlı olarak bir artışa neden oldu. Ayrıca, tüm 4-MU uygulamaları sonrasında, epidermis hücrelerinde MN oluşumu, epidermis ile korteks hücre deformasyonları, kortekste bazı kimyasal bileşiklerin birikmesi, belirgin olmayan iletim dokusu ve nekroz gibi kök anatmik değişimleri tespit edildi ve bu anatmik değişimlerin 500 µM 4-MU'da maksimum seviyelere ulaştığı bulundu. Sonuç olarak, 4-MU incelenen tüm parametreler üzerinde olumsuz bir etki gösterdi ve bu etkilerin izlenmesi için *Allium* test materyalinin yararlı bir biyoindikatör olabileceği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: *Allium cepa* L., Antioksidan enzimler, Çimlenme, Lipid peroksidasyonu, 4-metil umbelliferon, Sitogenetik

Using The *Allium* Test of 4-Methyl Umbelliferone: Physiological, Cytogenetic, Biochemical and Anatomical Evaluation

Abstract: In this study, the dose dependent effects of exogenous 4-methyl umbelliferone (4-MU) on various physiological, cytogenetic, anatomical and biochemical parameters using *Allium cepa* L. as test material were researched. The physiological parameters examined were germination percentage, root length, rootlet number and fresh weight; the cytogenetic parameters were micronucleus (MN) frequency, chromosome aberration (CA) and mitotic index (MI); the biochemical parameters were free proline content, malondialdehyde (MDA) level, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities. And the structural changes in root tip cells were investigated with anatomical sections. Structural changes in onion root tip cells were examined by taking anatomical sections. For these purposes, bulbs were divided into four groups as one control and three applications. The bulbs in the control group were treated with

distilled water; the bulbs in the application groups were treated with 125 µM, 250 µM and 500 µM doses of 4-MU for 7 days. 4-MU application caused a decrease in the physiological parameters compared to the control group. This treatment created an increase in the frequency of MN and CA, and a reduce in the MI. In addition, 4-MU application induced an increase as dose-dependent in CAT and SOD activities and MDA and free proline contents compared to the control group. Moreover, after all 4-MU application, anatomical changes such as MN formation in epidermis cells, epidermis and cortex cell deformations, accumulation of some chemical compounds in cortex, unclear transmission tissue and necrose were identified and these root anatomical changes were found to reach maximum levels at 500 µM 4-MU. As a result, 4-MU had a negative effect on all the investigated parameters and it was determined that the *Allium* test material could be a useful bioindicator for monitoring these effects.

Key words: *Allium cepa* L., Antioxidant enzymes, Germination, Lipid peroxidation, 4-methyl umbelliferone, Cytogenetic

1. Giriş

Fransızca bir terim olan ‘Coumarou’ olarak da bilinen kumarin ilk olarak 1820 yılında *Dipteryx odorata* Wild (tonka fasulyesi) ağacının tohumlarından doğal bir ürün olarak elde edilmiştir [1]. Bu tarihten itibaren zaman içerisinde çeşitli bakteri, mantar ve bitki türlerinden de çok sayıda kumarin izole edilmiş, kimyasal yapıları aydınlatılmış, sentetik olarak değiştirilmiş ve çeşitli biyolojik aktiviteleri için yaygın bir şekilde kullanılmışlardır [2-4]. Kumarinlerin temel yapısı (2H-1-benzopiran-2-on veya 1,2-benzopiran), bir piron halkası ile kaynaşmış benzenden oluşur ve benzopiron bileşikler ailesine aittir [5]. Kumarin halkası, birçok hedef bölgeye bağlanmayı kolaylaştıran yapısal ve fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Kumarinlerin bu çok yönlü yapısı, çeşitli ikame grupları ve konjugatlarıyla kombinasyonlar sağlayarak biyolojik aktivitelerini etkiler. Kumarinlerin bu konjuge sistemi, elektronlar açısından zengin olmasını sağlar ve iyi yük taşıma özelliklerini oluşturur [6]. Çok farklı ve çok yönlü yapısı, kumarin ve türevlerinin tıbbi kimya, organik kimya, malzeme ve çoklu moleküler kimya alanlarında sayısız uygulamalarda kullanımına olanak vermektedir. Ayrıca parfüm, kozmetik, gıda katkı maddeleri, optik parlaticılar [7] ve boya lazerleri [8] gibi alanlarda da geniş uygulamaları vardır [9]. Kumarinlerin yüksek çözünürlükleri, stabiliteyi, yüksek biyoyararlılıkları, terapötik ve farmakolojik aktiviteleri, düşük toksisiteyi, en az derecede yan etkileri gibi avantajlı özellikleri sayesinde ilaç keşfi ve geliştirmenin çeşitli aşamalarında incelenmelerine katkı sağlamaktadır [6, 10, 11]. Kumarinlerin en yüksek konsantrasyonu meyvelerde, çiçeklerde ve tohumlarda bulunur, bunu yapraklar, kökler ve gövdeler takip eder [12, 13]. Ayrıca lavanta yağı ve tarçın kabuğu yağı gibi uçucu yağlarda da kumarinlerin varlığı tespit edilmiştir [14-16].

4-metil umbelliferon (4-MU), kumarinler sınıfına ait bir bileşik olup dikkat çekici anti-paraziter, anti-kanser ve anti-oksidan aktivitelere sahiptir. [13, 17, 18]. Kimyasal ismi 7-hidroksi-4-metilkumarin veya himekromon olan bu bileşik, anason, kimyon, maydanoz ve dereotunu içeren umbelliferos bitkilerinden (Apiaceae) elde edilir [19]. 4-MU, benzopiron heterosikl iskeletine sahiptir ve en çok araştırılan kumarin ailesinin sentetik üyelerinden biridir. Binlerce sentetik kumarin arasında çok dikkat çekmesinin nedeni bileşiğin çeşitli kanser türlerinin fototerapi ve kemoterapisindeki potansiyelinden kaynaklanmaktadır [20]. 4-MU ve türevleri ayrıca anti-fungal [21], herbisit [22], insektisit [23], akarisit [24], mollusit ve anti-helmintik [25] gibi potansiyel pestisidal kullanımları vardır [22]. Ayrıca anti-psikotik [26], anti-depresan [27], anafilaksi [28] hipoglisemik [29], anti-inflamatuar [30] ve anti-bakteriyel [31] gibi çeşitli biyolojik özelliklerinin yanında anti-anjiyogenik [19] bileşik gibi de davranırlar.

Çoğunlukla soğan olarak bilinen *Allium cepa* L. türü, son taksonomik düzenlemelere göre *Allioideae* alt familyası ile *Amaryllidaceae* familyasına aittir. *Allium* cinsi, yaklaşık 850 tür içeren en büyük monokotil cinslerinden birisidir [32]. *A. cepa* L., ek ve lifli köklere sahip, 3-8 adet dikey iki sıra halinde düzenlenmiş, mat yeşil yapraklı olan iki yıllık bir bitkidir. Soğanları, konsantrik ve genişletilmiş etli yaprak tabanlarından yapılmıştır. Dış yaprak tabanı kurur, incilir ve çeşitli renklere bürünerek koruyucu tabakayı oluşturur, iç yaprak tabanları ise soğan geliştikçe kalınlaşır. Olgun soğan, küresel, oval veya uzun olabilir ve boyutu kültivarına bağlı olarak değişkenlik gösterir [33]. *A. cepa* L., dünya çapında hem sebze hem de lezzet verici olarak kullanılan en eski kültür bitkilerinden biridir [34].

Allium testi mutajenite ve toksisite olmak üzere iki hedefi birleştirir [35]. Toksikite, kök büyüme inhibisyonu gözlemlenerek ölçülür, mutajenite ise kromozom bozukluk oranı ile ilişkilendirilir. *Allium* testinin duyarlılığı, örneğin algler veya insan lenfositlerini kullanan test sistemleriyle aynı düzeydedir. Çeşitli organizmalar üzerinde yapılan birçok test, *Allium* testinin sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar vermiştir ve bu da *Allium* testini bir izlem testi olarak güvenilir bir test haline getirmektedir [36, 37]. Ayrıca bu test hızlı, ucuz ve hassas bir yöntemdir. Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) altındaki uluslararası işbirlikçi çalışmalarda çevresel kirleticilerin genetik izlenebilmesi için etkili bir test olarak onaylanmıştır [38].

Dışsal 4-MU uygulamasının çimlenme ve fide büyümesi üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmasına rağmen, fidelerin kök ucu hücrelerindeki antioksidan enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu, serbest prolin içeriği, Mİ, KA ve MN sıklığı ve anatomik değişimler üzerindeki rolü hakkında bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca, bahsedilen parametreler üzerine 4-MU'nun etkileri soğanda ilk kez rapor edilmiştir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, *A. cepa* L.'nin çeşitli fizyolojik, sitogenetik, anatomik ve biyokimyasal parametreleri üzerine 125 µM ila 500 µM arasında değişen konsantrasyonlardaki 4-MU'nun etkilerini belirlemektir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki materyali ve kimyasal madde konsantrasyonu

Bu çalışmada Erdoğan Ekinci Limited Şirketinden sağlanan *A. cepa* L. araştırma materyali olarak kullanıldı. Deneylerde kullanılan 4-MU konsantrasyonları 125 µM, 250 µM ve 500 µM'dir. 4-MU konsantrasyonları, tespit edilen EC50 dozuna göre belirlendi. EC50 dozunun 250 µM olduğu tespit edildi. EC50 dozunun iki katı olan 500 µM'lik bir doz ile en düşük doz olan 125 µM'lik doz tercih edildi. 4-MU, Sigma-Aldrich firmasından satın alındı.

2.2. Fizyolojik değişimler ve uygulama prosedürü

Çimlenme deneyleri, bir inkübatörde, karanlıkta ve sabit bir sıcaklıkta (20°C) gerçekleştirildi. Sağlıklı ve yaklaşık olarak eşit büyüklükteki soğanlar seçildi. Bu soğanlar, 10 dakika süreyle % 2.5 sodyum hipoklorit çözeltisi ile sterilize edildi ve 24 saat süreyle ultra-damıtılmış suyla yıkandı. Bu soğanlar dört gruba ayrıldı ve her bir uygulama grubuna ait yirmi adet soğan, plastik kapların içine yerleştirildi (Tablo 1).

Tablo 1. Test grupları ve çözeltiler

Gruplar	Çözeltiler
Grup I/Kontrol	Distile su
Grup II	125 µM 4-MU
Grup III	250 µM 4-MU
Grup IV	500 µM 4-MU

Plastik kaplar, 7 gün boyunca soğanların çimlendirilmesi amacıyla bir inkübatöre konuldu. 10 mm kök uzunluğuna ulaşan soğanlar çimlenmiş kabul edildi. 7. günün sonunda, çimlenme yüzdeleri ile kökçük sayıları belirlendikten sonra fidelerin kök uzunlukları mm cinsinden ölçüldü ayrıca taze ağırlıkları g/fide cinsinden kaydedildi [39]. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.3. Sitogenetik değişimlerin belirlenmesi

Birkaç gün sonra çimlenmiş *A. cepa* L. kök uçları, sitogenetik analizler için 1-1.5 cm uzunluğunda kesilerek alındı. Kesilen kök uçları, hücre bölünmesi sırasında bölünmeyi kontrol edebilecek ilk işlem çözeltisi olan doymuş para-diklorobenzen ile 4 saat ön işlemden geçirildi, gece boyunca oda sıcaklığında etanol-asetik asit (3:1) solüsyonunda sabitlendi ve kullanılıncaya kadar % 70 etanol içinde 4°C'de saklandı. Kök uçları 1 N HCl içerisinde 60°C'de 15 dakika hidroliz edildi, 1-1.5 saat Feulgen ile boyandı, bir damla % 45'lik asetik asitle parçalanarak ezildi [40]. 24 saatin sonunda, mikroskopik preparatlar balzam içine monte edilerek kalıcı hale getirildi. Mitotik fazlar ve mitotik anormallikler, Olympus CX41 mikroskobu üzerine monte edilmiş dijital kamera (Olympus C-5060) ile fotoğraflandırdı (500x). Mitotik indeks, yani sayılan bölünen hücre yüzdesi, her bir uygulama grubu başına en az 30.000 hücre (slayt başına yaklaşık 10.000 hücre) analiz edilerek değerlendirildi. Kromozomal anormallikler ise sayılan 2000 bölünen hücre yüzdesi olarak her bir uygulama grubu için hesaplandı. Mikronükleus (MN) sıklık testi, Fenech [41]'in kriterleri baz alınarak gerçekleştirildi. Buna göre:

- i- Mikronükleus hücre çekirdeğinin 1/3'ü veya daha küçük olmalıdır.
- ii- Mikronükleus yuvarlak veya oval olmalıdır.
- iii- Mikronükleus membranı, hücre çekirdeğinden açıkça ayırt edilebilir olmalıdır.

2.4. SOD ve KAT tayini

SOD ve KAT analizleri için, 0.2 g taze kök materyali toplanmış ve 5 ml soğutulmuş sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.8) ile homojenleştirildi. Bu homojenatlar 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı enzim analizleri için kullanıldı. SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich [42] tarafından önerilen metoda göre hesaplandı. 1.5 ml 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.8), 0.3 ml 130 mM metiyonin, 0.3 ml 750 µM nitroblue tetrazolyum klorid, 0.3 ml 0.1 mM EDTA-Na₂, 0.3 ml 20 µM riboflavin, 0.01 ml süpernatant, 0.01 ml % 4 polivinilpirolidon ve 0.28 ml deiyonize su içeren bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu reaksiyon, iki adet 15 W floresan lamba altında 10 dakika süreyle tüplerin tutulmasıyla başlatılmış ve daha sonra tüpler karanlıkta 10 dk süreyle tutularak işlem sonlandırılmış ve absorbans 560 nm'de ölçülmüştür [43]. Spesifik SOD aktivitesi (U/mg FW), mg taze ağırlık başına birim olarak ifade edildi.

KAT aktivitesi, Beers ve Sizer [44] tarafından önerilen protokole göre ölçülmüştür. KAT aktivitesi, kullanımdan hemen önce hazırlanan 0.3 ml 0.1 M H₂O₂, 1.0 ml deiyonize su ve 1.5 ml 200 mM sodyum fosfat tamponu içeren 2.8 ml'lik bir reaksiyon karışımında 25°C'de bir UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bu reaksiyon 0.2 ml süpernatant ilave edilerek başlatıldı. KAT aktivitesi, H₂O₂ tüketiminin bir sonucu olarak absorbanstaki (240 nm) düşüşün ölçülmesiyle belirlendi. Aktivite, taze ağırlık gramı başına dakikada birim olarak ifade edildi; bir KAT aktivite birimi (OD_{240nm}/dk. g FW), 240 nm'lik absorbanstaki 0.1'lik bir değişiklik olarak belirlendi.

2.5. Lipid peroksidasyon tayini

Lipid peroksidasyonu, Ünyayar vd. [45] tarafından önerilen protokole göre belirlendi. Kök uçları (0.5 g), bir homojenleştirici (Ultraturrax, T25-B) yardımıyla % 5 trikloroasetik asit (TCA) içinde homojenleştirildi. Daha sonra bu homojenizatlar 24°C'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. % 20'lik bir TCA solüsyonunda, % 0.5 tiyobarbitürik asit ve süpernatant, eşit hacimli yeni bir tüpe aktarılmış ve 96°C'de 25 dk kaynatıldı. Süre sonunda, tüpler buz banyosuna alınmış ve 5 dakika süreyle 10000 rpm'de santrifüj edildi. Absorbans 532 nm'de ölçüldü ve MDA içeriği 155 M⁻¹ cm⁻¹ tükenme katsayısı kullanılarak hesaplandı ve MDA düzeyleri standart sapma (SS) ile ortalama olarak ifade edildi.

2.6. Prolin tayini

Serbest prolin içeriği Bates vd. [46]'nin metoduna göre belirlendi. Dondurulmuş kök dokusu (0.5 g), 4°C'de 10 ml % 3 sülfosalisilik asit ile homojenleştirildi. Bu ekstrakt, Whatman No. 2 filtre kağıdı ile süzülmüştür. Bir test tüpünün içinde, 2 ml süzüntü, 2 ml asit-ninhidrin ve 2 ml glasiyal asetik asit karıştırıldı ve 100°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Bu reaksiyon buz üzerinde sonlandırıldı ve reaksiyon karışımı daha sonra 4 ml toluen ile özümlendirildi. Kromofor içeren toluen, hidratlı fazdan ayrıldı. 520 nm'de absorbans, kör olarak toluen ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Prolin konsantrasyonu, standart bir eğriye göre hesaplandı ve µmol prolin g/FW olarak ifade edildi.

2.7. Anatomik değişimlerin belirlenmesi

Soğan köklerinin yüzeyindeki kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla kök uçları distile su ile yıkandı. Daha sonra kök uçlarından keskin bir jilet yardımıyla enine kesitler alındı ve % 2'lik metilen mavisi ile boyandıktan sonra her bir grubun boyanan örnekleri araştırma mikroskobu ile 500x büyütmede incelendi [47, 48].

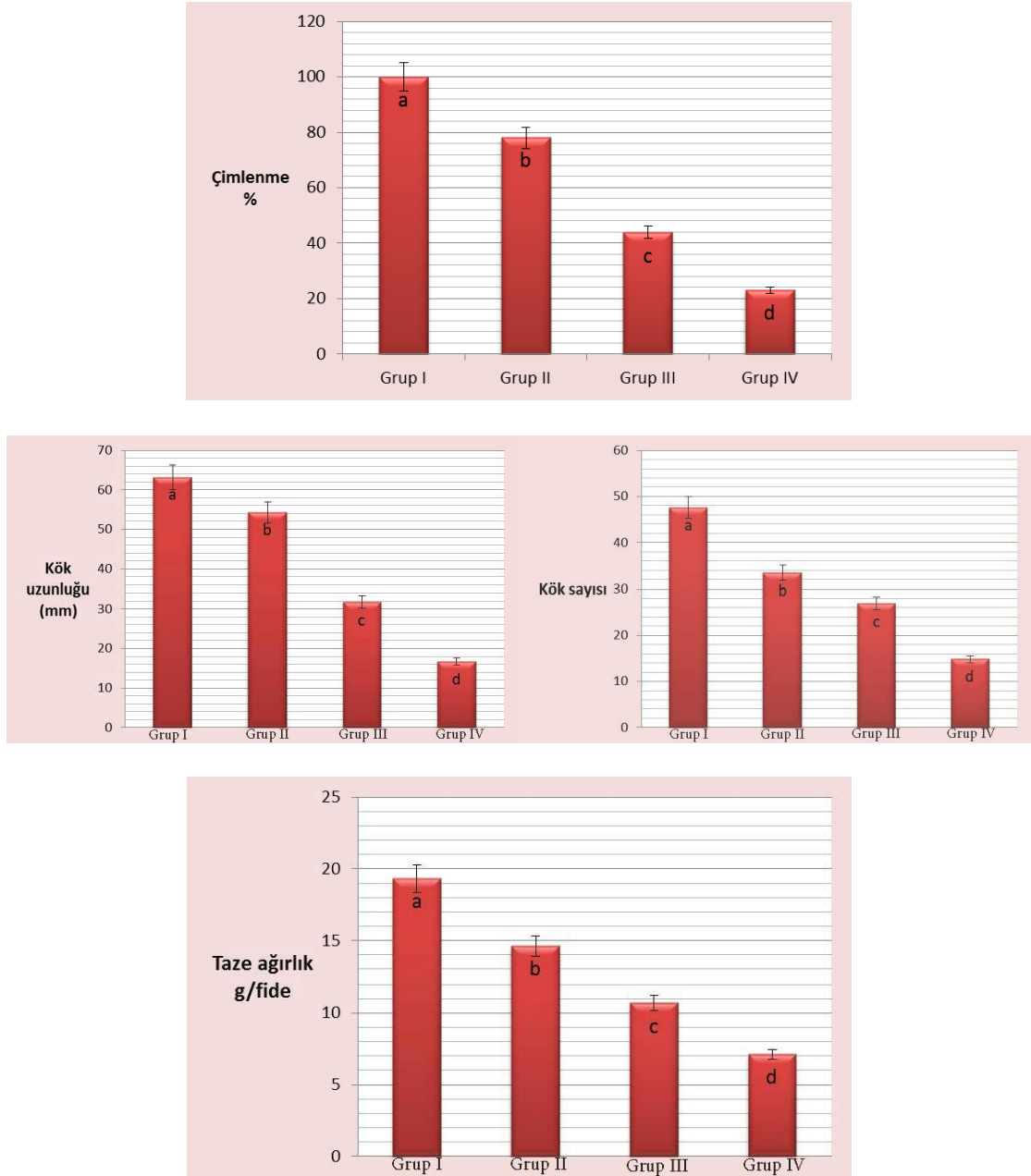
2.8. İstatistiksel analizler

İstatistiksel verilerin analizi için SPSS istatistik V 23.0 (IBM Corp., ABD, 2015) paket programı kullanıldı. Tüm sonuçlar, ortalama değerler ± standart sapmalar olarak sunuldu. Ortalama değerler arasındaki farklılıkların istatistiksel önemi, Duncan Multiple Range Test analizi ile değerlendirildi ve P <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

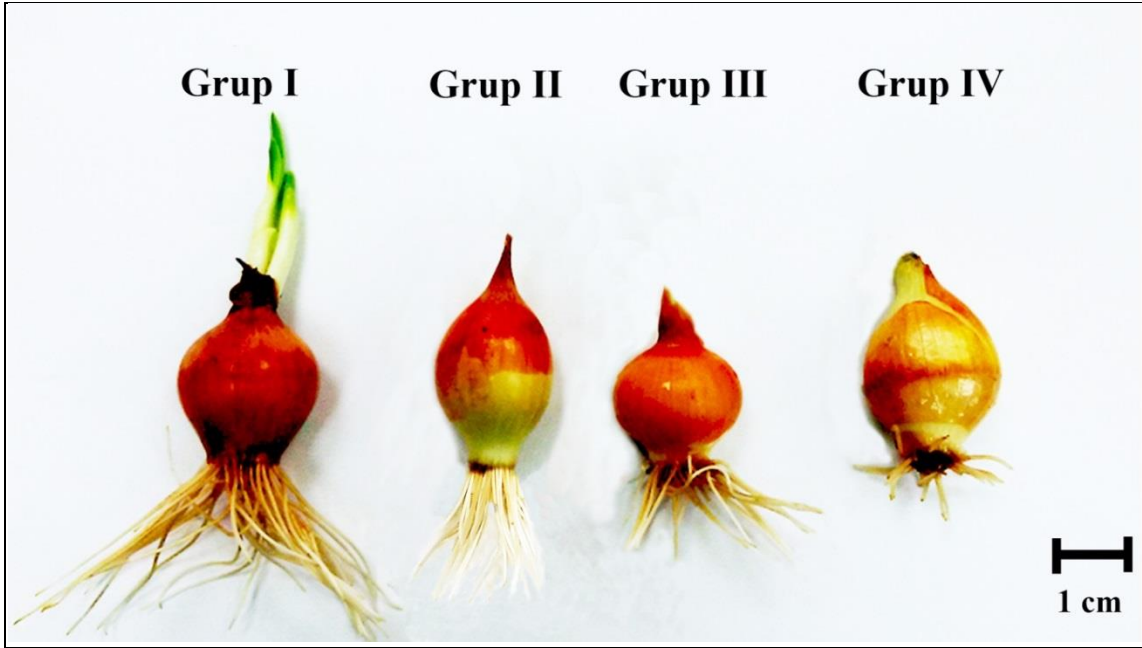
3. Sonuçlar ve tartışma

3.1. 4-MU'nun fizyolojik parametreler üzerindeki etkisi

A. cepa L.'nin fizyolojik parametreleri üzerine dışsal 4-MU'nun etkileri Şekil 1'de gösterildi. İnkübasyonun 7. gününde kontrol grubunun (Grup I) çimlenme yüzdesi % 100 ± 0.0 iken bu değer 125 μM , 250 μM ve 500 μM 4-MU düzeylerinde sırasıyla % 78 ± 2.8 , % 44 ± 2.4 ve % 23 ± 1.2 olmuştur. Diğer bir ifadeyle, 4-MU'nun artan konsantrasyonları çimlenme yüzdesini kontrolle kıyaslandığında (Grup I) 125 μM ' da % 22, 250 μM ' da % 56 ve 500 μM konsantrasyonda % 77 azaltmıştır. Benzer şekilde, soğan fidelerinin kök uzunlukları, kökçük sayıları ve taze ağırlıkları artan 4-MU düzeyleri ile önemli ölçüde azalmıştır. Maksimum kök uzunluğu kontrol grubunda (Grup I) ortalama 63.2 ± 2.1 mm ve minimum kök uzunluğu 500 μM 4-MU ile muamele edilen Grup IV'te ortalama 16.7 ± 0.6 mm olarak ölçülmüştür. Kök uzunluğu, kontrol grubuna (Grup I) göre 4-MU ile muamele edilen Grup II'de 8.9 mm, Grup III'te 31.4 mm ve Grup IV'de 46.5 mm azalmıştır. Distile su ortamında çimlendirilen Grup I (kontrol) soğanlarının kökçük sayısı 47.6 ± 1.4 iken bu değer 125 μM 4-MU konsantrasyonunda 33.5 ± 1.1 , 250 μM 4-MU'da 26.9 ± 0.7 ve 500 μM 4-MU'da 14.8 ± 0.3 olmuştur. 500 μM 4-MU kökçük sayısını kontrol grubuna göre yaklaşık 3.2 kat azaltmıştır (Şekil 2). Grupların ortalama taze ağırlıkları Grup I'de 19.3 ± 1.0 g, Grup II'de 14.6 ± 0.8 g, Grup III'de 10.7 ± 0.5 g ve Grup IV'te 7.1 ± 0.2 g olarak belirlendi. Maksimum taze ağırlık, kontrol grubunda (Grup I) ve en düşük taze ağırlık ise 4-MU'un 500 μM 'lik bir dozu ile muamele edilen Grup IV'te belirlendi. Bu düşüşler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Dışsal 4-MU'nun tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerindeki etkileri hakkında az sayıda çalışma bulunmasına karşın, söz konusu kimyasalın soğan çimlenmesi ve büyümesi üzerindeki etkileri konusunda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Abenavoli vd. [49] ve Li vd. [50], 100 μM ve 125 μM 4-MU uygulanmasının *Arabidopsis thaliana* tohumlarında birincil kök büyümesini azaltarak tohum çimlenmesini engellediğini ve ayrıca kalın ve yuvarlak kök kıllarının oluşumuna ve düzensiz ayrılmış kök gelişimine yol açtığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Bernhard [51], 10^{-4} M dışsal 4-MU'ya maruz bırakılan *Raphanus sativus* L. tohumlarında kayda değer bir çimlenme inhibisyonunun meydana geldiğini tespit etmiştir ve söz konusu araştırmacıların bulgularıyla bu çalışmanın sonuçları tutarlılık göstermektedir. Harashima ve Schnittger [52], bitkilerin kök büyümesinin doğrudan uzama seviyesine ve farklılaşma aşamasındaki hücre sayısına bağlı olduğunu bildirmiştir. Güçlü bir kök büyümesi için sağlıklı bir mitotik bölünme şarttır [53]. 4-MU'nun kök sayısı ve kök uzaması üzerindeki inhibe edici etkisi, hücre bölünmesinin azalmasından kaynaklanabilir. Çünkü bu çalışmada 4-MU kök ucu meristem hücrelerinin mitotik aktivitesini azaltmıştır (Şekil 3). Ayrıca 4-MU ortamında soğanların taze ağırlığı ve su içeriğinin azaldığını gösteren sonuçlar köklerin yeterli su almaması ile açıklanabilir (Şekil 1). Diğer yandan, söz konusu uygulama hücrelerde lipid peroksidasyonunu artırarak (Şekil 6) membran hasarına neden olduğu için soğan çimlenmesine müdahale etmiş olabilir.



Şekil 1. *A. cepa* L.'nin bazı fizyolojik parametreleri üzerine 4-MU'nun etkisi. Grup I (kontrol) distile su; Grup II 125 µM 4-MU; Grup III 250 µM 4-MU; Grup IV 500 µM 4-MU ile muamele edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir (± SS)

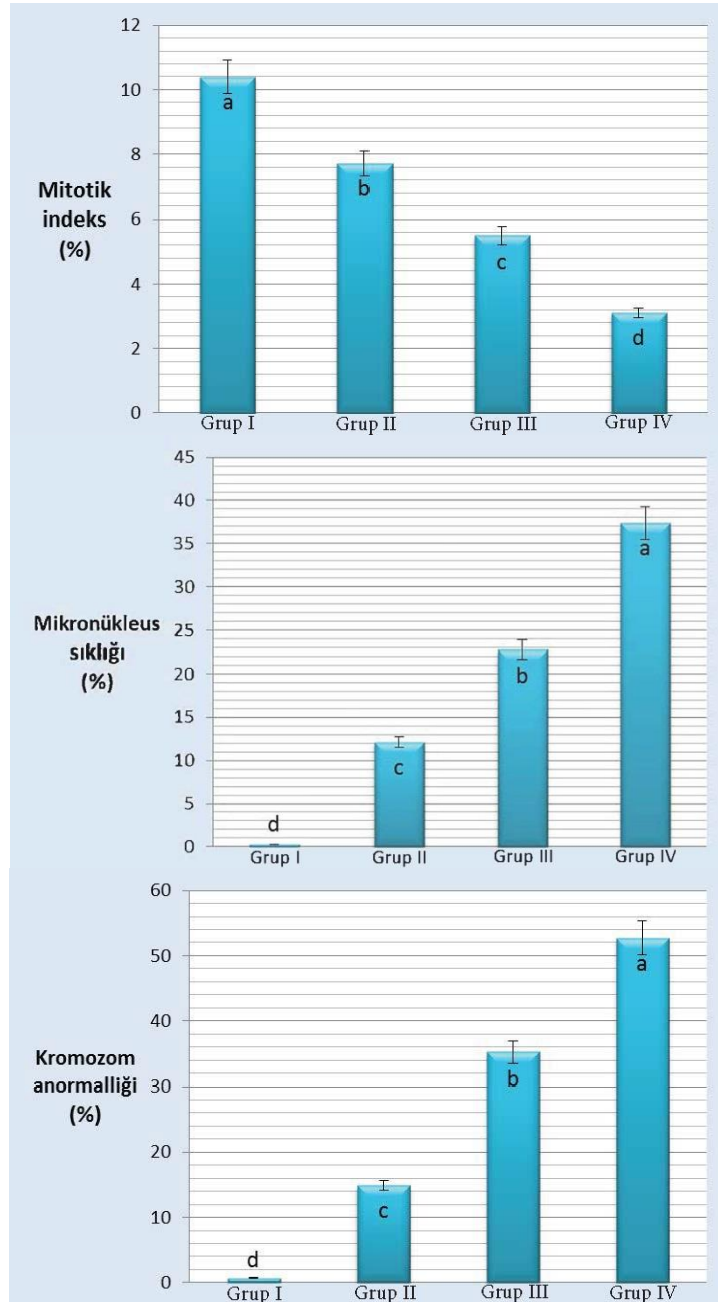


Şekil 2. *A. cepa* L. soğanlarının yedinci gün sonundaki çimlenme durumları. Grup I (kontrol) distile su; Grup II 0.125 µM 4-MU; Grup III 250 µM 4-MU; Grup IV 500 µM 4-MU ile muamele edilmiştir. Ölçek = 1 cm

3.2. 4-MU'nun sitogenetik parametreler üzerindeki etkisi

Bazı kimyasal ajanlar stressiz koşullarda bile mitotik düzensizliklere, hücre bozulmalarına ve kromozomal anormalliklerine neden olabilirler [54, 55]. Gözden geçirilen literatür incelemeleri sonucunda fidelerin kök ucu hücrelerinde mitotik indeks (Mİ), mikronükleus (MN) sıklığı ve kromozomal anormallikleri (KA'lar) gibi sitogenetik parametreler üzerine dışsal 4-MU'nun etkileri hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, mevcut çalışmanın sitogenetik sonuçları ilk kez rapor edildiğinden son derece önemlidir. Konsantrasyon artışına paralel olarak, 4-MU'nun Mİ, MN frekansı ve KA'lar üzerindeki toksik etkisi artmıştır (Şekil 3). Bir test bileşiğinin sitotoksosite düzeyi, çevresel biyoizlem çalışmalarında sitotoksosite parametresi olarak kullanılabilen Mİ'deki artış veya azalmaya bağlı olarak belirlenebilir [56]. Veriler incelendiğinde Mİ kontrol grubunda (Grup I) % 10.4±0.9, Grup II' de % 7.7±0.7, Grup III' de % 5.5±0.3 ve Grup IV'de ise % 3.1±0.1 olarak belirlendi. 4-MU'ya maruziyetin bir sonucu olarak, bahsedilen gruplarda Mİ, kontrole (Grup I) göre sırasıyla yaklaşık % 2.7, % 4.9 ve % 7.3 oranında azalmıştır. Bu bulgulara bağlı olarak, artan 4-MU dozu ile Mİ'nin azaldığı gözlemlendi. Yani Mİ ve 4-MU uygulama dozları ters orantı sergilemişlerdir. 4-MU'nun, uygulama dozuna bağlı olarak *A. cepa* L. kök ucu hücrelerinde MN oluşumunu teşvik ettiği bulunmuştur. Mikroskobik incelemeler sonucunda, kontrol grubu olan Grup I'de MN oluşumunun çok az (% 0.3±0.4) olduğu gözlemlendi. Ancak artan 4-MU dozları ile uygulama gruplarındaki MN oluşum oranı artmıştır. MN sıklığı Grup II' de % 12.1±0.6, Grup III' de % 22.8±1.4 ve Grup IV' de % 37.4±1.9 olarak belirlendi. Grup IV'te, MN sayısı Grup I'e (kontrol) göre 37.1 kat artmıştır. Mevcut veriler, 4-MU uygulamasının soğanların kök ucu meristem hücrelerindeki KA sayısını arttırdığını gösterdi. Örneğin, distile su ortamında çimlendirilen Grup I (kontrol) soğanlarının kök ucu meristemlerindeki KA'ların sıklığı % 0.7±0.5 iken bu değer 125 µM 4-MU konsantrasyonunda % 14.9±0.9, 250 µM' da % 35.2±1.4 ve 500 µM' da % 52.7±1.6 olmuştur. 500 µM 4-MU uygulaması ile anormalliklerin sıklığı, kontrol grubuna (Grup I) göre 52 kat artmıştır. Her bir grup diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı sonuçlara sahip olmuştur ($p < 0.05$). MN ve

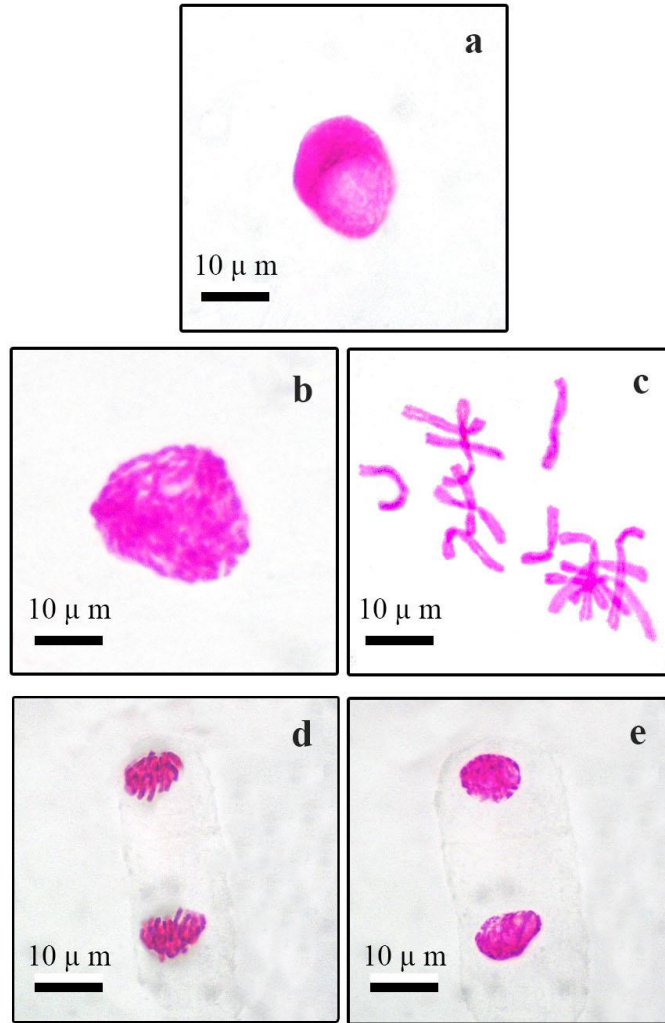
KA'lerin sıklığındaki dikkate değer artışlar, 4-MU'nun *A. cepa* L. için genotoksik bir ajan olduğunu açıkça göstermiştir.



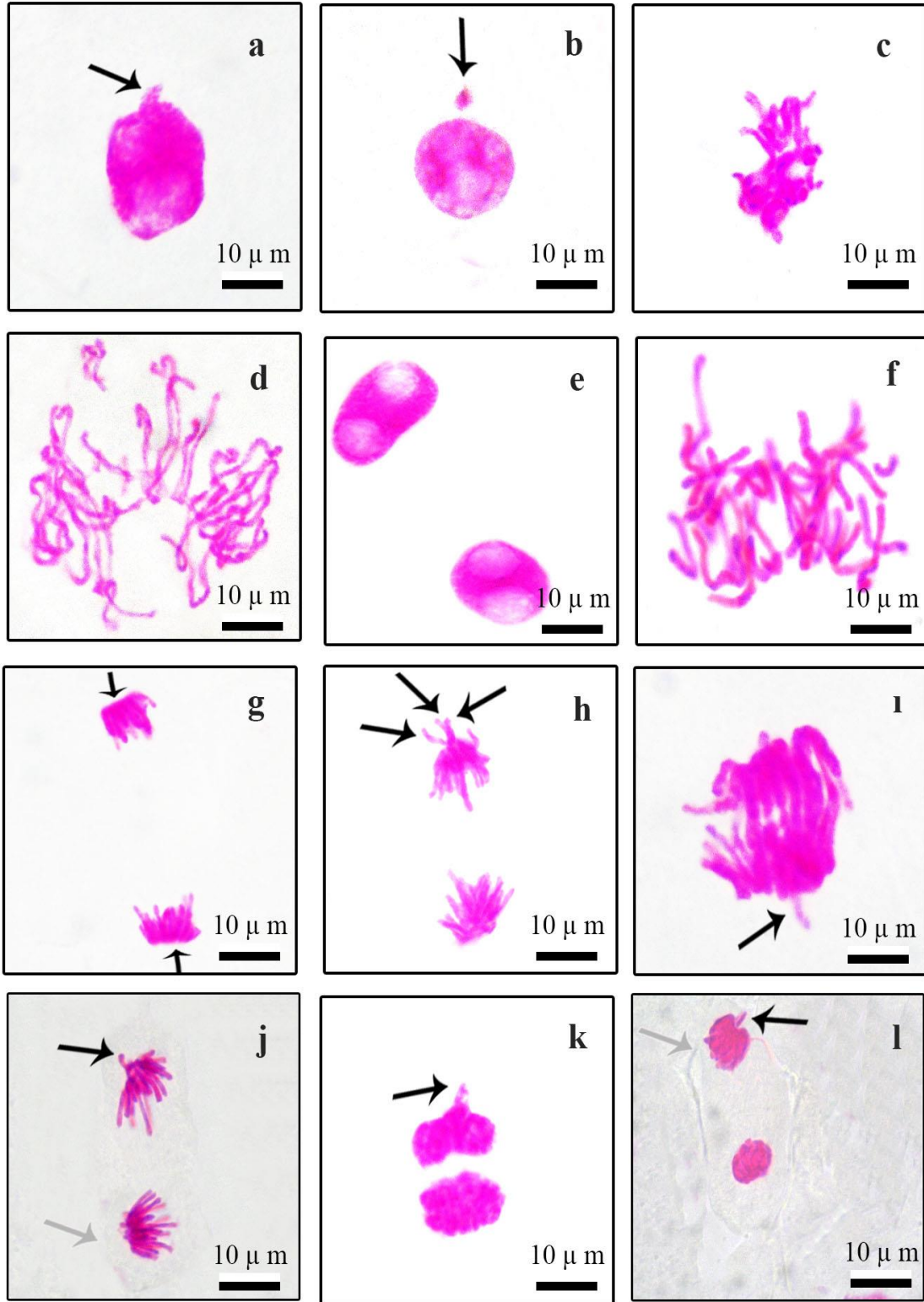
Şekil 3. *A. cepa* L.'nin bazı sitogenetik parametreleri üzerine 4-MU'nun etkisi. Grup I (kontrol) distile su; Grup II 125 μ M 4-MU; Grup III 250 μ M 4-MU; Grup IV 500 μ M 4-MU ile muamele edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir (\pm SS)

Şekil 4'te, kök ucu meristem hücrelerinin mikroskopik incelemesi sırasında gözlemlenen normal mitotik evreleri ve Şekil 5'te anormal mitotik evreleri göstermektedir. En belirgin anormallikler: nükleer tomurcuklu çekirdek (Şekil 5a), mikronükleus (Şekil 5b), kromozom yapışıklığı (Şekil 5c), düzensiz profaz (Şekil 5d), vakuolasyon çekirdekleri (Şekil 5e), düzensiz anafaz (Şekil 5f), anafazda kutup düzleşmeleri (Şekil 5g), anafazda kalgın kromozomlar (Şekil 5h, 1, j), anafazda çoklu köprü oluşumu (Şekil 5i), telofazda kalgın kromozom (Şekil 5k, l), anafaz/telofazda kutup kaymaları (Şekil 5j, l) olarak belirlendi. Bir nükleer deformasyon olan

vakuolasyon çekirdekleri, mitoz bölünmesinin S fazı sırasında DNA sentezi üzerindeki bir nükleer 214 zehirinin baskılayıcı etkisinin bir göstergesidir [57]. Nükleer tomurcuklu çekirdekler, çekirdeğe katılmaları dışında morfolojik olarak mikronükleuslara benzerlik göstermektedir [58]. MN oluşumu ve nükleer tomurcuk oluşumu, genetik materyallerin kaybı ile sonuçlanabilir [59]. Gözlemlenen MN, telofaz evresi sırasında her iki kardeş çekirdeğin dâhil edilememesinden ve telofazda geride kalan kromozomlardan ve kromozom kırılmalardan kaynaklanır [60, 61]. Düzensiz profaz, iğ ipliklerinin bağlanamamasından veya eşit olarak ayrılamamasından dolayı meydana gelir ve kromozom kaybına neden olabilir [62]. Düzensiz anafaz, kromozomların hücreye düzensiz bir şekilde yayılmasına izin veren eksen düzeneği bozukluğundan kaynaklanabilir [63]. Anafazda köprü oluşumu, büyük bir olasılıkla kromozom yapışıklığından ve bozulmuş kromozom ayrışımından meydana gelmektedir. Köprü oluşumu, muhtemelen kromozom yapışkanlığı nedeniyle veya eşit olmayan translokasyon sonucu ve kromozomda yapısal mutasyona neden olarak kromatidlerin veya kromozomların birleşmesi ve kesintiye uğramasından oluşmaktadır [64]. Anafaz ve telofazda kutup kaymaları, iğ bozukluklarından kaynaklanmaktadır [65]. Kalgın kromozomlar ise eşit olmayan kromozomlara sahip kardeş hücrelerdeki düzensiz şekilli veya eşit olmayan boyuttaki çekirdeklerden türemişlerdir [66].



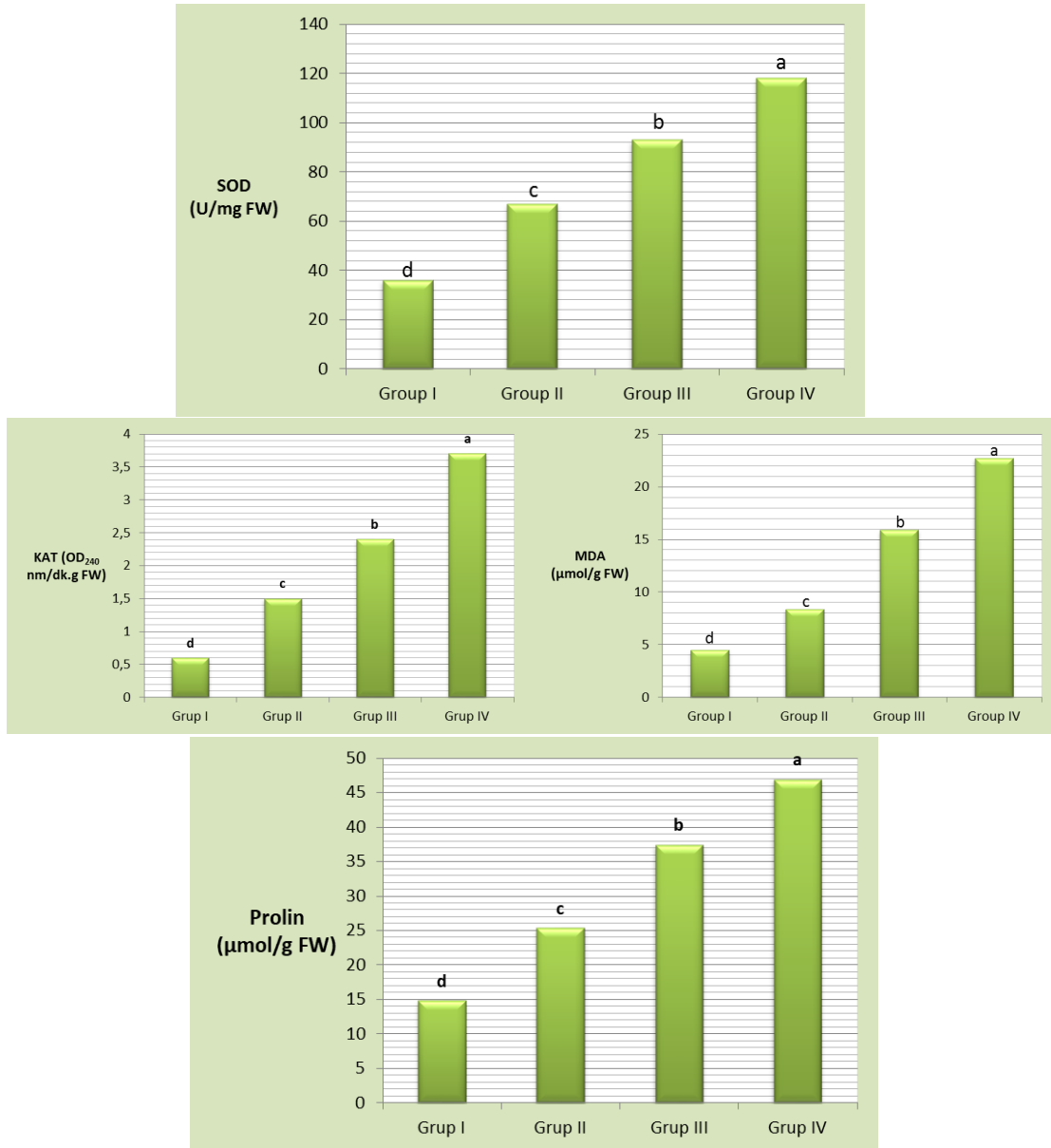
Şekil 4. *A. cepa* L. kök ucu meristem hücrelerindeki normal mitoz evreleri; a- interfaz; b- profaz; c- metafaz, $2n = 16$ kromozom; d- anafaz; e- telofaz. Ölçek= 10 µm



Şekil 5. Dışsal 4-MU ile indüklenen *A. cepa* L. kök ucu hücrelerindeki kromozomal anormallikler; a- nükleer tomurcuklu çekirdek=ok; b- mikronükleus=ok; c- kromozom yapışıklığı; d- düzensiz profaz; e- vakuolasyon çekirdekleri; f- düzensiz anafaz; g- anafazda kutup düzleşmeleri=oklar; h- anafazda kalgın kromozomlar=oklar; ı- anafazda çoklu köprü oluşumu ve kalgın kromozom=ok; j- anafazda kutup kayması (gri ok) ve kalgın kromozom (siyah ok); k- telofazda kalgın kromozom=ok; l- telofazda kutup kayması (gri ok) ve kalgın kromozom (siyah ok) Ölçek = 10 µm

3.3. 4-MU'nun biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi

Normal koşullar altında yetiştirilen fidelerin köklerinde SOD ve KAT aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve serbest prolin içeriği gibi biyokimyasal parametreler üzerine dışsal 4-MU'nun etkileri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu araştırmadan elde edilen biyokimyasal bulgular son derece önemlidir. Reaktif oksijen türleri (ROS) tehlikeli sitotoksik moleküllerdir, ancak aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemek için ara sinyal molekülleri olarak da işlev görürler. Bitkiler, ROS'un neden olduğu hasarla başa çıkmak için antioksidan sistemlere sahiptirler [67-69]. Antioksidan enzimler bu sistemlerin önemli bir parçasını oluştururlar. Antioksidan enzimler arasında; süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve dioksijene orantısızlığını katalizleyen SOD ile H₂O₂'yi ortadan kaldıran KAT yer almaktadır. SOD, aktif bölge metal kofaktörüne (Mn, Fe veya Cu, Zn) bağlı olarak bilinen üç sınıfı olan ve oksidatif strese karşı korumada anahtar rol oynayan metalloenzimlerdir. KAT, nükleer genler tarafından kodlanan çoklu izozimler olarak var olan tetramerik homoproteinlerdir. Çoğunlukla peroksizomlarda ve glioksizomlarda bulunurlar [70]. Bu çalışmada, 4-MU uygulamasının neden olduğu oksidatif stresi izlemek için SOD, KAT, MDA ve prolin analizleri kullanıldı. Şekil 6, 4-MU tarafından indüklenen SOD, KAT MDA ve prolin seviyelerindeki değişiklikleri göstermektedir. Artan 4-MU dozları, *A. cepa* L. köklerinde SOD ve KAT aktivitelerinde önemli bir artışı tetikledi. 4-MU ile muamele edilen gruplarda artan KAT ve SOD aktiviteleri, bu antioksidan sistemin oksidatif stres varlığında indüklendiğini göstermektedir. SOD aktivitesi Grup I' de (kontrol) 36±1.7 U/mg FW, Grup II' de 67±2.9 U/mg FW, Grup III' te 93±3.1 U/mg FW ve Grupta IV' de 118±3.6 U/mg FW olarak ölçülmüş iken Grup I, Grup II, Grup III ve Grup IV'ün KAT seviyeleri sırasıyla 0.6±0.2 OD_{240nm}/dk. g FW, 1.5±0.2 OD_{240nm}/dk. g FW, 2.4±0.6 OD_{240nm}/dk. g FW ve 3.7±0.9 OD_{240nm}/dk. g FW olarak belirlendi. Bu iki enzimin yüksek düzeyleri, 4-MU'un *A. cepa*'da aşırı ROS üretimine neden olduğunu göstermektedir (Şekil 6).



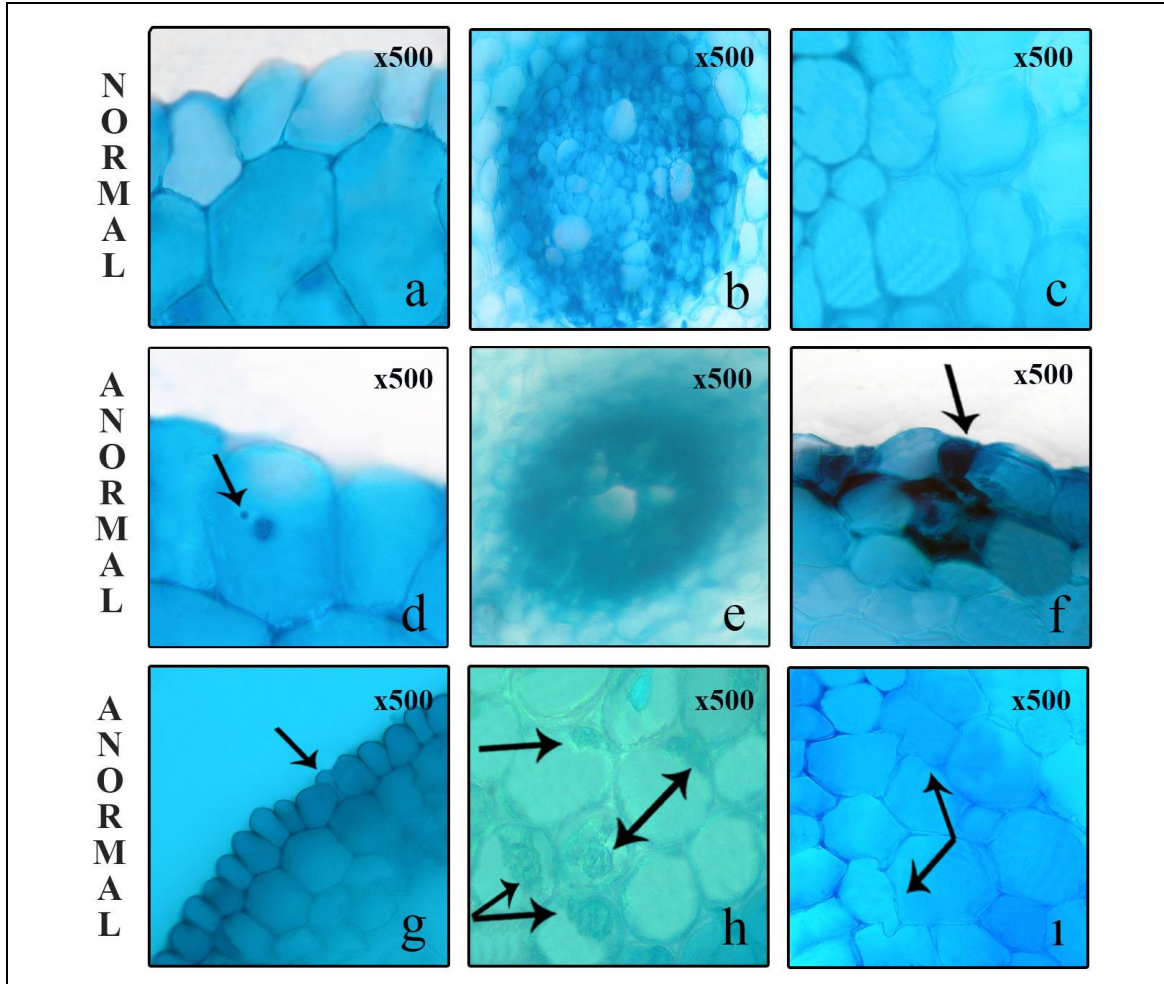
Şekil 6. *A. cepa L.*'nin bazı biyokimyasal parametreleri üzerine 4-MU'nun etkisi. Grup I (kontrol) distile su; Grup II 125 μM 4-MU; Grup III 250 μM 4-MU; Grup IV 500 μM 4-MU ile muamele edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir (± SS)

Lipid peroksidasyonu, ROS ve lipidlerin, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin ve MDA üretiminin oksidatif yıkımına neden olan metabolik bir süreçtir [71]. Hücre membran hasarı, MDA içeriğinin artmasına neden olur [72]. MDA, membran lipidlerinin oksidatif bir ürünüdür ve oksidatif stres düzeylerini gösteren biyolojik bir belirteçdir [73]. ROS, lipidler, proteinler, RNA ve DNA dâhil olmak üzere biyolojik moleküllerin peroksidasyonuna zarar verir [74, 75]. Serbest oksijen grupları, DNA üzerine etki ederek nükleik asitlerde mutasyonlara ve kromozomlarda değişikliklere neden olabilirler [76]. MDA düzeyleri doza bağlı olarak 4-MU uygulamasının bir sonucu olarak önemli ölçüde yükselmiştir. Kontrol grubu (Grup I) köklerinde MDA içeriği ortalama 4.5 ± 1.3 μmol/g FW olarak ölçülürken, 4-MU dozlarındaki artışa paralel olarak MDA içeriği artış göstermiştir. Grup II, Grup III ve Grup IV'ün MDA düzeyleri sırasıyla 8.4 ± 1.8 μmol/g FW, 15.9 ± 2.9 μmol/g FW ve 22.7 ± 3.5 μmol/g FW olarak belirlendi. 4-MU uygulaması sonucunda MDA düzeylerinde gözlenen artışlar, antioksidan-oksidan dinamiklerinde bozulma olduğunu göstermektedir (Şekil 6).

Prolin, ozmotik strese maruz kalan bitkilerde en yaygın üretilen ozmolitlerden birisidir [77]. Bir ozmolit olan prolin, ozmotik stres altında ozmotik potansiyel ve turgorun korunmasında önemli bir rol oynayabilir [78, 79]. Aynı zamanda prolin, dehidrasyon sırasında proteinleri ve hücrel membranları stabilize ederek hücreleri koruyan ana bileşiktir [80-82]. Prolin bitkilerde glutamat ve ornitin yoluyla sentezlenir. Ozmotik stres altında, glutamat yolu, prolin üretiminin ana kaynağıdır. Prolin oksidaz, ozmolitlerin birikmesinden sorumlu ana düzenleyici enzimdir; bu enzim prolini glutamata dönüştürür [83]. Bu araştırmada kontrol grubu (Grup I) köklerinin serbest prolin içeriği $14.8 \pm 1.3 \mu\text{mol/g FW}$ olmuştur. Bu değer Grup II' de $25.3 \pm 1.7 \mu\text{mol/g FW}$, Grup III' te $37.4 \pm 2.0 \mu\text{mol/g FW}$ ve Grup IV' te $46.9 \pm 3.5 \mu\text{mol/g FW}$ olarak ölçülmüştür. Yani 4-MU uygulaması kontrole göre serbest prolin içeriğini $125 \mu\text{M}$ ' de yaklaşık 1.7 kat, $250 \mu\text{M}$ ' de 2.5 kat ve $500 \mu\text{M}$ konsantrasyonda 3.1 kat artırmıştır (Şekil 6). Bu artışlar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Mevcut çalışma bulgularıyla uyumlu olarak, MDA ve prolin birikimi arasında pozitif bir ilişki kaydedildi [84], bu ozmolitin üretilen ROS'u temizlemeye etkin bir şekilde katıldığını ve böylece hücreleri oksidatif hasardan koruduğunu düşündürmektedir [85].

3.4. 4-MU'nun anatomik parametreler üzerindeki etkisi

Soğan kök ucu meristem hücrelerinde dışsal 4-MU'nun neden olduğu anatomik değişiklikler ve hasarlar Şekil 7'de gösterildi. Mikroskopik incelemeler sonucunda kontrol grubunun (Grup I) kök ucu meristem hücrelerinde hiçbir anatomik hasar tespit edilmedi. 4-MU uygulanan grupların kök ucu anatomik kesitlerinde ise MN oluşumu, belirgin olmayan iletim dokusu, nekroz, epidermis/korteks hücre deformasyonları ve bazı kimyasal bileşiklerin kortekste birikmesi gibi anatomik hasarlar ve değişimler gözlemlendi. Epidermis hücrelerindeki deformasyon (Şekil 7g), hücre zarının karakteristik yapısındaki bozulma ile açıklanabilir. 4-MU kök yapısına ilk olarak epidermis dokusu yoluyla girdiği için, etkiler burada başlamaktadır. 4-MU tarafından indüklenen bir lipid peroksidasyonu (Şekil 6) epidermal membran yapısına zarar verebilir ve hücre deformasyonlarını meydana getirebilir. Kök dokusunda epidermis tabakasını geçebilen kimyasal ajanlar kortekse ulaşırlar. 4-MU uygulaması sonrasında korteks hücrelerinde madde birikimi (Şekil 7h) gibi anatomik değişimler toksisiteye karşı geliştirilen tepkilerdir. Ancak bazı durumlarda yüksek toksik etki anatomik değişikliklerden çok anatomik hasarlara neden olabilir. Bu çalışmada gözlenen nekroz (Şekil 7f) ve epidermis/korteks hücrelerindeki deformasyonlarının (Şekil 7g, ı) $500 \mu\text{M}$ 4-MU uygulama grubunda baskın olması da bu hipotezi doğrulamaktadır. Yüksek 4-MU uygulamasında daha baskın olarak gözlenen nekrozlar geri dönüşümsüzdür. Bitkiler veya bitki hücre kültürleri strese maruz kaldıklarında nekrotik morfoloji ile hızlı hücre ölümünü başlatırlar. Nekrotik alanlar kahverengi-siyah lekeler olarak görünürler. Bu nedenle, 4-MU uygulamasından sonra kortekste bazı kimyasal bileşiklerin birikimi (Şekil 7h), hasardan ziyade kimyasala maruziyete karşı anatomik bir adaptasyondur. Bu verilerden, düşük 4-MU uygulamalarında daha fazla anatomik değişikliğin gözlemlendiği ve yüksek 4-MU uygulamasında ise ciddi anatomik hasarların meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Görüldüğü gibi literatürde soğan bitkisinin kök anatomisi üzerine 4-MU etkisine dair herhangi bir veri rapor edilmemiştir. Bu nedenle, 4-MU ile ilgili mevcut çalışmanın anatomik sonuçları ilk kez rapor edildiğinden son derece önemlidir. Literatürde çeşitli toksik ajanlara karşı *A. cepa* kök anatomisinde belirgin olmayan iletim dokusu, hücre çekirdeğinde düzleşme, korteks hücre duvarında kalınlaşma, epitel/korteks hücre deformasyonu gibi birçok anatomik adaptasyon ve hasarın meydana geldiği bildirilmiştir [47, 48].



Şekil 7. Dışsal 4-MU ile indüklenen *A. cepa* L. kök meristem hücrelerindeki anatomik değişimler; a- kontrol grubunda epidermis hücrelerinin normal görünümü; b- kontrol grubunda iletim dokusunun normal görünümü; c- kontrol grubunda korteks hücrelerinin normal görünümü; d- 4-MU ile muamele edilen gruplarda epidermis hücrelerinde MN oluşumu=ok; e- 4-MU ile muamele edilen gruplarda belirgin olmayan iletim dokusu; f- 4-MU ile muamele edilen gruplarda nekroz=ok; g- 4-MU ile muamele edilen gruplarda epidermis hücre deformasyonu=ok; h- 4-MU ile muamele edilen gruplarda korteks hücrelerinde madde birikimleri=oklar; i- 4-MU ile muamele edilen gruplarda korteks hücrelerinin deformasyonu=oklar

4. Sonuç

Bu çalışma, dışsal 4-MU'un doza bağlı çoklu etkilerini kapsamlı bir şekilde araştırmıştır. Soğanın burada incelenen fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik parametreleri üzerine dışsal 4-MU uygulamasının etkileri ile ilgili mevcut literatür verisi bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut çalışmanın sonuçları ilk kez rapor edilmektedir. Bu sonuçlar 4-MU'un, *A. cepa* L. kök anatomik yapısını, çimlenme, kök uzunluğu, kökçük sayısı ve taze ağırlık gibi fizyolojik parametrelerini, Mİ, MN sıklığı ve KA'lar gibi sitogenetik parametrelerini ve SOD, KAT, MDA ve prolin içeriği gibi biyokimyasal parametrelerini etkileyen toksik bir bileşik olarak hareket ettiğini göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmanın tutarlı sonuçları, *A. cepa*'nın çeşitli kimyasal ajanların aktivitelerini değerlendirmede faydalı bir model olduğunu göstermiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Dilek Çavuşoğlu: Araştırma, İnceleme ve Düzenleme, Orijinal Taslak Yazımı, Yazılım, Görselleştirme.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışmanın yazarı olarak herhangi bir destek ve teşekkür beyanımın bulunmadığını bildiririm.

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarı olarak herhangi bir çatışma beyanımın bulunmadığını bildiririm.

Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri

Bu çalışmanın yazarı olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımın bulunmadığını bildiririm.

Kaynaklar

- [1] D. Srikrishna, C. Godugu, and P. K. Dubey, "A Review on Pharmacological Properties of Coumarins," *Mini-Rev. Chem.*, 18 (2), 113–141, 2018.
- [2] M. Iranshahi, M. Askari, A. Sahebkar, and D. Adjipavlou-Litina, "Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxigenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin," *DARU J. Pharm. Sci.*, 17 (2), 99–103, 2009.
- [3] M. K. Bashir, Y. F. and M. K. Mustafa, "Oglah Antitumor, antioxidant, and antibacterial activities of glycosyl-conjugated compounds: A review," *Syst. Rev. Pharm.*, 11, 175–187, 2020.
- [4] Y. F. Mustafa, E. T. Mohammed, and R. R. Khalil, "Antioxidant and antitumor activities of methanolic extracts obtained from Red Delicious and Granny Smith apples' seeds," *Syst. Rev. Pharm.*, 11, 570–576, 2020.
- [5] Y. Aoyama, T. Katayama, M. Yamamoto, H. Tanaka, and K. Kon, "A new antitumor antibiotic product, demethylchartreusin. Isolation and biological activities," *J. Antibiot.*, 45 (6), 875–878, 1992.
- [6] X. M. Peng, G. V. Damu, and C. Zhou, "Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry," *Cur. Pharm. Des.*, 19 (21), 3884–3930, 2013.
- [7] G. H. Zhang, H. Zheng, M. Y. Guo, L. Du, G. J. Liu, and P. Wang, "Synthesis of polymeric fluorescent brightener based on coumarin and its performances on paper as light stabilizer, fluorescent brightener and surface sizing agent," *Appl. Surf. Sci.*, 367, 167–173, 2016.
- [8] V. R. Mishra, and N. Sekar, "Photostability of coumarin laser dyes-A mechanistic study using global and local reactivity descriptors," *J. Fluoresc.*, 27, 1101–1108, 2017.
- [9] M. J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O. Abreu, E. Molina Pe'rez, and E. Yordi, "Coumarins-An important class of phytochemicals," in *Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, A. Venket Rao and Leticia G. Rao, Eds., 2015, pp. 113–140.
- [10] H. Wang, X. Lu, H. Yao, J. Feng, and R. Liu, "Research progress on application of coumarin and its derivatives," *Chem. Ind. Times.*, 23 (8), 40–43, 2009.
- [11] F. Annunziata, C. Pinna, S. Dallavalle, L. Tamborini, and A. Pinto, "An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities," *Int. J. Mol. Sci.*, 2 (13), 2020.
- [12] M. Miranda, and A. Cuéllar, "Farmacognosia y productos naturales," Fe'lix Varela, La Habana, Ed., *Rev. Cuba. de Plantas Medicinales.*, 9, 34–49, 2001.
- [13] K. N. Venugopala, V. Rashmi, and B. Odhav, "Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity," *Bio. Med. Res. Int.*, 963248, 2013.
- [14] J. Choi, K. T. Liu, H. Ka, W. T. Jung, H. J. Jung, and H. J. Park, "Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties," *Arch. Pharm. Res. (Seoul).*, 24 (5), 418–423, 2001.
- [15] F. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, and U. Matern, "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes," *Phytochem. Rev.*, 5 (2), 293–308, 2006.
- [16] S. Rosselli, A. M. Maggio, N. Faraone, V. Spadaro, S. L. Morris-Natschke, K. F. Bastow, K. H. Lee, and M. Bruno, "The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol," *Nat. Prod. Commun.*, 4 (12), 2009.
- [17] G. Vialart, A. Hehn, A. Olry, K. Ito, C. Krieger, R. Larbat, C. Paris, B. Shimizu, Y. Sugimoto, M. Mizutani, and F. Bourgaud, "A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L.

- exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants," *Plant J.*, 70, 460–470, 2012.
- [18] R. Ramalingam, and M. Vaiyapuri, "Effects of umbelliferone on lipid peroxidation and antioxidant status in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma," *J. Acute Med.*, 3, 73–82, 2013.
- [19] J. A. García-Vilas, A. R. Quesada, and M. Á. Medina, "4-Methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo," *J. Agric. Food Chem.*, 61, 4063–4071, 2013.
- [20] S. Medimagh-Saidana, A. Romdhane, M. Daami-Remadi, H. Jabnoun-Khiareddine, D. Touboul, H. Ben Jannet, et al., "Synthesis and antimicrobial activity of novel coumarin derivatives from 4-methylumbelliferone," *Med. Chem. Res.*, 24 (8), 3247–3257, 2015.
- [21] L. Pan, X. Li, H. Jin, X. Yang, and B. Qin, "Antifungal activity of umbelliferone derivatives: Synthesis and structure-activity relationships," *Microb. Pathog.*, 104, 110–115, 2017.
- [22] L. Pan, X. Z. Li, Z. Q. Yan, H. R. Guo, and B. Qin, "Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure-activity relationships and action mechanism," *Plant Physiol. Bioch.*, 97, 272–277, 2015.
- [23] M. Deshmukh, P. Pawar, M. Joseph, M. Phalgune, U. Kashalkar, R. Deshpande, and R. Nirmala, "Efficacy of 4-methy-7-hydroxy coumarin derivatives against vector," *Indian J. Exp. Biol.*, 46 (11), 788–792, 2008.
- [24] Y. Wei, S. Q. Li, and S. H. Hao, "New angular oxazole-fused coumarin derivatives: Synthesis and biological activities," *Nat. Prod. Res.*, 32 (15), 1824–1831, 2018.
- [25] G. L. Liu, Y. Hu, X. H. Chen, G. X. Wang, and F. Ling, "Synthesis and anthelmintic activity of coumarin-imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 5039–5043, 2016.
- [26] P. Arora, M. S. Ranawat, and N. Arora, "Synthesis and screening of some novel coumarin derivatives for antipsychotic activity," *Res. J. Pharm. Technol.*, 5 (18), 968–972, 2012.
- [27] K. Ostrowska, K. Młodzikowska, M. Głuch-Lutwin, A. Grybo's, and A. Siwek, "Synthesis of a new series of aryl/heteroarylpiperazinyl derivatives of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin with low nanomolar 5-HT 1A affinity," *Eur. J. Med. Chem.*, 137, 108–116, 2017.
- [28] S. T. Nam, Y. H. Park, H. W. Kim, H. S. Kim, D. Lee, M. B. Lee, Y. M. Kim, and W. S. Choi, "Suppression of IgE-mediated mast cell activation and mouse anaphylaxis via inhibition of Syk activation by 8-formyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin, 4-8C," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 332, 25–31, 2017.
- [29] X. J. Hu, X. B. Wang, and L. Y. Kong, "Glucosidase inhibitors via green pathway: Biotransformation for bicoumarins catalyzed by *Momordica charantia* peroxidase," *J. Agric. Food Chem.*, 61, 1501–1508, 2013.
- [30] E. Radwan, and I. A. Reem, "Anti-inflammatory screening and molecular modeling of some novel coumarin derivatives," *Molecules*, 20, 5374–5391, 2015.
- [31] Y. F. Mustafa, E. T. Mohammed, and R. R. Khalil, "Synthesis, characterization, and anticoagulant activity of new functionalized biscoumarins," *Egyptian J. Chem.*, 64, 4461–4468, 2021.
- [32] L. Peruzzi, A. Carta, and F. Altinordu, "Chromosome diversity and evolution in *Allium* (Allioideae, Amaryllidaceae)," *Plant Biosyst.*, 151, 212–220, 2017.
- [33] T. K. Lim, "Modified stems, roots, bulbs," in Springer, Netherlands, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, 2015, pp. 124–203.
- [34] M. Marrelli, V. Amodeo, G. Statti, and F. Conforti, "Biological properties and bioactive components of *Allium cepa* L.: focus on potential benefits in the treatment of obesity and related comorbidities," *Molecules*, 24, 119–136, 2019.
- [35] S. B. Tedesco, and I. V. H. D. Laughinghouse, "Bioindicator of genotoxicity. The *Allium cepa* test," *J. Environ. Contam.*, 138–156, 2012.
- [36] G. Fiskesjo, "The *Allium* test as a standard in environ-1535 mental monitoring," *Hereditas*, 102, 99–112, 1985.
- [37] T. R. Chaparro, C. M. Botta, and E. C. Pires, "Biodegradability and toxicity assessment of bleach plant effluents treated anaerobically," *Water Sci. Technol.*, 62, 1312–1319, 2010.
- [38] W. F. Grant, "Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical back ground on their use for screening and monitoring environmental chemicals," *Mutat. Res.*, 426, 107–112, 1999.
- [39] K. Çavuşoğlu, and D. Çavuşoğlu, "Role of L-ornithine in mitigation salt stress in *Allium cepa* L.," *Bangl. J. Bot.*, 50(4), 1165–1171, 2019.
- [40] P. C. Sharma, and P. K. Gupta, "Karyotypes in some pulse crops," *Nucleus*, 25, 181–185, 1982.
- [41] M. Fenech, W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, and E. Zeiger, "HUMN (human micronucleus) project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures," *Mutation. Res.*, 534, 65–75, 2003.
- [42] C. Beauchamp, and I. Fridovich, "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels," *Anal. Biochem.*, 44, 276–287, 1971.

- [43] J. Zou, J. Yue, W. Jiang, and D. Liu, "Effects of cadmium stress on root tip cells and some physiological indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L.," *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 54, 129–141, 2012.
- [44] R. F. Beers, and I. W. Sizer, "Colorimetric method for estimation of catalase," *J. Biol. Chem.*, 195, 133–139, 1952.
- [45] S. Ünyayar, A. Celik, F. O. Cekic, and A. Gozel, "Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*," *Mutagenesis*, 21, 77–81, 2006.
- [46] L. S. Bates, R. P. Waldren, and I. D. Teare, "Rapid determination of free proline for water stress studies," *Plant Soil.*, 39, 205–207, 1973.
- [47] K. Çavuşoğlu, T. Kalefetoğlu Macar, O. Macar, D. Çavuşoğlu, and E. Yalçın, "Comparative investigation of toxicity induced by UV-A and UV-C radiation using *Allium test*," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29, 33988–33998, 2022.
- [48] D. Çavuşoğlu, O. Macar, T. Kalefetoğlu Macar, K. Çavuşoğlu, and E. Yalçın, "Mitigative effect of green tea extract against mercury (II) chloride toxicity in *Allium cepa* L. model," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29, 27862–27874, 2022.
- [49] M. R. Abenavoli, A. Nicolò, A. Lupini, S. Oliva, and A. Sorgonà, "Effects of different allelochemicals on root morphology of *Arabidopsis thaliana*," *Allelopathy J.*, 22, 245–252, 2008.
- [50] X. Li, M. Y. Gruber, D. D., Hegedus, D. J., Lydiate, and M. J., Gao, "Effects of a Coumarin Derivate, 4-Methylumbelliferone, on Seed Germination and Seedling Establishment in *Arabidopsis*," *J. Chem. Ecol.*, 37, 880–890, 2011.
- [51] R. A. Bernhard, "Some Studies of Coumarin and Coumarin Analogues as Germination Inhibitors of Radish Seeds," *Bot. Gaz.*, 17–21, 2016.
- [52] H. Harashima, and A. Schnittger, "The integration of cell division, growth and differentiation," *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13, 66–74, 2010.
- [53] L. F. Andrade, L. C. Davide, and L. S. Gedraite, "The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73, 626–631, 2010.
- [54] A. Acar, Z. Turkmen, K. Cavusoglu, and E. Yalçin, "Investigation of benzyl benzoate toxicity with anatomical, physiological, cytogenetic and biochemical parameters in vivo," *Caryologia*, 73, 21–32, 2020.
- [55] G. Öztürk, K. Çavusoglu, and E. Yalçın, "Dose-response analysis of potassium bromate-induced toxicity in *Allium cepa* L. meristematic cells," *Env. Sci. Pollut. Res.*, 27, 43312–43321, 2020.
- [56] T. C. C. Fernandes, D. E. C. Mazzeo, and M. A. Marin Morales, "Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *A. cepa* exposed to trifluralin herbicide," *Pest. Biochem. Physiol.*, 88, 252–259, 2007.
- [57] N. A. Sutan, A. Popescu, C. Mihaescu, L. C. Soare, and M. V. Marinescu, "Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide Ridomil in *Allium cepa* L.," *Analele Stiint Univ. Al I Cuza Iasi.*, 60, 5–12, 2014.
- [58] M. Fenech, and J. W. Crott, "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay," *Mutat. Res.*, 504, 131–136, 2002.
- [59] C. Ruan, Y. Lian, and J. Lium, "Application of micronucleus test in *Vicia faba* in the rapid deletion of mutagenic environmental pollutants," *Chin J. Environ. Sci.*, 4, 56–58, 1992.
- [60] M. Fenech, "The in vitro micronucleus technique," *Mutat. Res.*, 455, 81–95, 2000.
- [61] H. Norppa, and G. C. Falck, "What do human micronuclei contain?," *Mutagenesis*, 18, 221–233, 2003.
- [62] D. Gisselsson, E. Palsson, C. Yu, F. Mertens, and N. Mandahl, "Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours," *Cancer Lett.*, 206, 69–76, 2004.
- [63] L. Luzhna, P. Kathiria, and O. Kovalchuk, "Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond," *Front. Genet.*, 4, 131, 2013.
- [64] S. Türkoğlu, "Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.," *Mutat. Res.*, 626, 4–14, 2007.
- [65] V. P. Kalcheva, A. P. Dragoeva, K. N. Kalchev, and D. D. Enchev, "Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells," *Genet. Mol. Biol.*, 32, 389–393, 2009.
- [66] A. A. El-Ghamery, M. A. El-Kholy, and M. A. Abou El-Yousser, "Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L.," *Mutat. Res.*, 537, 29–41, 2003.
- [67] S. J. Neill, R. Desikan, A. Clarke, R. D. Hurst, and J. T. Henscock, "Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants," *J. Exp. Bot.*, 53, 1237–1247, 2002.

- [68] E. Vranova, D. Inze, and F. Van Breusegen, "Signal transduction during oxidative stress," *J. Exp. Bot.*, 53, 1227–1236, 2002.
- [69] A. K. Srivastava, and D. Singh, "Assessment of malathion toxicity on cytophysiological activity, DNA damage and antioxidant enzymes in root of *Allium cepa* model," *Sci. Rep.*, 10, 1–10, 2020.
- [70] A. M. S. Soares, T. F. Souza, T. Jacinto, and O. L. T. Machado, "Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves," *Braz. J. Plant Physiol.*, 22, 151–158, 2010.
- [71] V. J. Odjegba, and R. A. Adeniran, "Bentazone herbicide induces genotoxic effect and physiological disorders in non-targeted *Allium cepa* L.," *Indian J. Plant Physiol.*, 20, 375–379, 2015.
- [72] I. S. Fedina, and K. M. Benderliev, "Response of *Scendesmus incrassatulus* to salt stress as affected by methyl jasmonate," *Biol. Plant.*, 43, 625–627, 2000.
- [73] D. R. Janero, "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury," *Free Radic. Biol. Med.*, 9, 515–540, 1990.
- [74] K. Shah, R. G. Kumar, S. Verma, and R. S. Dubey, "Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings," *Plant Sci.*, 161, 1135–1144, 2001.
- [75] C. Dinakar, V. Abhaypratap, S. R. Yearla, A. S. Raghavendra, and K. Padmasree, "Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation," *Planta*, 231, 461–474, 2010.
- [76] E. Yarsan, "Lipid peroxidation event and its applications for prevention," *Van. Vet. J.*, 9, 89–95, 2014.
- [77] M. Ashraf, and M. R. Foolad, "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance," *Environ. Exp. Bot.*, 59, 206–216, 2007.
- [78] S. T. Sadiqov, M. Akbulut, and V. Ehmedov, "Role of Ca²⁺ in drought stress signaling in wheat seedlings," *Biochem.*, 67, 491–497, 2002.
- [79] R. Munns, and M. Tester, "Mechanisms of salinity tolerance," *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651–681, 2008.
- [80] S. G. Kumar, A. M. Reddy, and C. Sudhakar, "NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance," *Plant Sci.*, 165, 1245–1251, 2003.
- [81] C. A. Martinez, M. Maestri, and E. G. Lani, "In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance," *Plant Sci.*, 116, 117–184, 2003.
- [82] X. S. Wang, and J. G. Han, "Changes in proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress," *Agric. Sci. China.*, 8, 431–440, 2009.
- [83] O. Çelik, and C. Atak, "The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties," *Turk. J. Biol.*, 36, 339–356, 2012.
- [84] F. Boughalleb, R. Abdellaoui, M. Mahmoudi, and E. Bakhshandeh, "Changes in phenolic profile, soluble sugar, proline, and antioxidant enzyme activities of *Polygonum equisetiforme* in response to salinity," *Turk. J. Bot.*, 44, 25–35, 2020.
- [85] J. Matysik, B. Alia-Bhalu, and P. Mohanty, "Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants," *Curr. Sci.*, 82, 525–532, 2002.