

## **BİTKİLERDE GENOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN PARAMETRELER VE UYGULANAN TEST SİSTEMLERİ**

### **PARAMETERS USED IN GENOTOXICITY STUDIES OF PLANTS AND APPLIED TEST SYSTEMS**

**Dilek AKYIL<sup>1\*</sup>, Arzu ÖZKARA<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve  
Genetik Bölümü, Afyonkarahisar*

**Geliş Tarihi (Received): 29/12/2015 Kabul Tarihi (Accepted): 07/07/2015**

#### **ÖZET**

Araştırmacılar son yıllarda hem insanlar tarafından hem de doğal olarak meydana gelmiş birçok mutajenin varlığını açık bir şekilde göstermişlerdir. Bu mutajenler hava ve su kirleticilerinin yanı sıra gıdalar, ilaçlar, kozmetik ürünleri, pestisitler, ev yapımı ve endüstriyel kimyasallar gibi birçok kimyasal sınıftan meydana gelmektedir. Genotoksik kimyasalların artması ve radyasyon seviyesinin yükselmesi ile meydana gelen bu kirlilik artışı ekosistemi ve insanların da içinde bulunduğu tüm organizmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Kontaminantların organizmalar üzerine etkisini belirlemek amacıyla hızlı ve kesin metotlara ihtiyaç vardır. Genotoksik maddelerin etkilerini tanımlayabilmek için birçok genotoksisite test sistemi geliştirilmiştir. Var olan birçok araştırma göstermiştir ki bitki biyotestleri çevredeki genotoksik kontaminasyonun değerlendirilmesi ve çevre kontrol sistemlerinde oldukça önemli metotlardır. Bitki testleri gen mutasyonları ve kromozom aberasyonları gibi geniş bir alanı kapsayan genetik hasarların belirlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca diğer testlere göre oldukça hassas ve kolay uygulanabilen ve uluslararası geçerliliği olan bitki biyotestleri çevresel kirleticilerin genotoksik etkisinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu derleme ile bitkilerde yaygın olarak kullanılan genotoksisite ölçütü parametreler ve bu parametreleri içeren bazı çalışmaların değerlendirilmeye alınması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, mitotik indeks, mikronükleus, kromozom aberasyonu

#### **ABSTRACT**

Researcher over the last years has clearly demonstrated the presence of mutagens among the numerous man-made and naturally occurring chemicals in our environment. These mutagens occur in all classess of chemicals, including foods, drugs, cosmetics, pesticides, household and

\*Sorumlu Yazar: [dilekakyil9@gmail.com](mailto:dilekakyil9@gmail.com)

industrial chemicals as well as in pollutants of both air and water. The increase of pollution by the release of genotoxic chemicals and the increase of radiation levels has affected the ecosystem and the health of organisms, including humans. There is a need for quick and precise methods for the detection of contamination and their effects on organisms. Numerous genotoxicity assay systems have been developed to identify the effect of genotoxins. The available data show that plant bioassays are important tests in the detection of genotoxic contamination in the environment and the establishment of controlling systems. Plant system can detect a wide range of genetic damage, including gene mutations and chromosome aberrations. Plant bioassays, which are more sensitive and simpler than most methods used to detect the genotoxic effects of environmental pollutants, have been validated in international collaborative studies and demonstrated to be efficient tests for monitoring genotoxicity of environmental pollutants. The aim of this review was to evaluate some genotoxic parameters and different studies which involve these parameters in plants.

**Key Words:** Genotoxicity, mitotic index, micronucleus, chromosome aberration

### 1. GİRİŞ

İnsanoğlu yüzyıllardan bu yana içinde yaşadığı çevreyi kendi yararına kullanmak için olumlu ya da olumsuz olarak etkilemektedir. Gelişen teknoloji yaşam standartlarının artmasını beraberinde getirmiş, buna paralel olarak insanların çevre üzerinde olan hakimiyeti de artış göstermiştir. Ancak insanoğlunun artan bu çevre hakimiyeti bazı olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir. Bu durum pek çok canlı ile beraber insanlığın kendi varlığını da tehlikeye düşürmüştür. Çevresel kirleticiler, tarımsal üretimi artırmak ve ürün kalitesini yükseltmek için kullanılan tarım ilaçları, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve tat/estetik açıdan eklenen gıda katkı maddeleri, kozmetik ürünler, ilaçlar, savaşlar ve endüstriyel atıklar çevre kirliliğine büyük ölçüde sebep olan etmenlerdir ve tüm bu kimyasal maddeler insanoğlunun faaliyetleri sonucunda meydana gelmektedir. Sonuçta tüm bu çevresel kirleticiler pek çok canlının günlük yaşamlarına doğrudan ya da dolaylı olarak zarar vermekte ve çevre kirliliği tüm ülkelerde önemli bir sorun haline gelmektedir. Dolayısıyla piyasaya sürülen bu kimyasal maddelerin canlılar üzerinde olumsuz etkileri olup olmadığının tespit edilmesi son derece önemlidir. Bu amaçla hava, su ve toprak kontaminasyonlarının değerlendirilmesi ve tespitinde hızlı sonuç

alınabilecek hassas metotlara ihtiyaç vardır (Sandhu et al., 1994; Maluszynska and Juchimiuk, 2005).

1900'lü yıllardan bu yana genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Son dönemlerde çevresel mutajenlerin belirlenmesi için kısa zamanlı test sistemlerinin gelişiminde önemli ilerlemeler olmuştur. *In vitro* testler, mutasyonlar, kromozom kırılmaları ve diğer genetik etkileri belirlemek için *in vivo* testlere göre daha kullanışlı, ekonomik ve hızlı birçok testi kapsamaktadır (Barile, 2008).

Yüksek yapılı bitkiler, genetik materyallerinin yüksek oranda korunmuş yapısı sebebiyle çevresel kirleticilerin sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerinin değerlendirilmesi bakımından genotoksisite testlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Leme and Marin-Morales, 2009; Özkara et al., 2011; Rodríguez et al., 2015).

Dolayısıyla çevresel kirleticilerin neden olduğu muhtemel genetik hasarın değerlendirilmesinde bitki test sistemleri yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak bitkiler köklerinin meristematik yapısı ve kromozomlarının boyutları sebebiyle genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan oldukça uygun sitogenetik materyallerdir (Fiskesjö, 1985; Ma et al., 1995). Yüksek bitkiler hayvanlarla karşılaştırıldığında çevresel maddelerin genotoksisitelerinin değerlendirilmesinde analizlerinin basit olması, hassas olmaları ve kolay elde edilebilir olmaları hususunda oldukça kullanışlı modellerdir (Grant, 1992; Türkoğlu vd., 2009). Ayrıca bitkilerin kullanıldığı test sistemlerinin güvenilir ve ucuz maliyetli olmaları bu metodların son yıllarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Saxena et al., 2005; Konuk et al., 2007; Özkara et al., 2014). Buna karşın bitkilerin hayat sikluslarının bakteri, maya ve benzeri organizmalara göre daha uzun olması bu test sistemlerinin kullanılmasında sınırlayıcı bir etken olarak değerlendirilebilir (Grant and Salamone, 1994).

Çevresel kirleticiler ve farklı kimyasal maddelerin aktiviteleri *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Crepis capillaris*, *Glycine max*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana*, *Pisum sativum*, *Tradescantia* ve *Zea mays* gibi farklı bitkiler üzerinde analiz edilmektedir. Yapılan analizlerde ise ortalama kök uzunluğu, çimlenme oranı, mitotik indeks, mikronükleus sıklığı ve mitotik anormallikler (anafaz köprüsü, yapışıklık vb.) gibi parametreler

değerlendirmeye alınmaktadır. Çalışmalarda genellikle bu parametrelerden bir veya birkaçı kombine edilerek kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlar uygun istatistiksel analiz metotlarıyla yorumlanmaktadır. Ayrıca pek çok çalışmada kimyasal maddelerin genotoksik etkisinin saptanmasında bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle kimyasalların genotoksik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (Mortelmans and Rupa, 2004; Olaharski et al., 2006).

Bu derleme ile farklı kimyasal maddelerin genotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan parametreler ve farklı bitki test sistemleriyle son yıllarda yapılan çalışmalara değinilmiştir.

## **2. BİTKİ TEST SİSTEMLERİ**

Bilindiği gibi çevresel kirleticilerin ve çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Crepis capillaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Tradescantia*, *Lens culinaris* ve *Zea mays* gibi bitkiler kullanılmaktadır. Bu bitkilerde mitotik indeks (Mİ), mitotik anormallikler, kardeş kromatid değişimi (KKD) mikronükleus sıklığı (MN) ve DNA hasarı (Comet vb.) gibi parametreler değerlendirilmeye alınmaktadır.

### **2.1. Mitotik İndeks (Mİ)**

Mitotik indeks yaşayan tüm organizmalar için sitotoksik bir ölçüt olarak kabul edilmektedir (Amer and Aly, 1992). Sitotoksik seviye mitotik indeks oranındaki değişmelerle belirlenebilmektedir (Linnainmaa et al., 1978; Smaka-Kincl et al., 1996). Azalmış mitotik indeks, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir (Gökalp Muranlı, 2006). Mitotik indekste azalma, kontrole göre %22'nin altına düşerse letal etki (Antonsie-wiez, 1990), %50'nin altına düşerse subletal etki (Panda and Sahu, 1985) değeri olarak kabul edilmektedir.

Mitotik indeksi belirlemek için hazırlanan her bir konsantrasyondan en az 5000-6000 hücre sayımı gerçekleştirilmelidir ve mitotik indeks yüzdesi aşağıdaki formülle ifade edilmektedir.

$$MI (\%) = \frac{\text{mitoza girmiş hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$$

Mitotik indeksi belirlemek için kullanılacak olan konsantrasyonların seçiminde öncelikle kök büyümesi inhibisyon testi yapılarak uygun doz aralığı tespit edilmektedir. Bunun için kontrole göre kök uzunluğunun %50 azalmasına neden olan

konsantrasyon ( $EC_{50}$ ) değeri belirlenmelidir. Çünkü kullanılan herhangi bir bitkinin kromozomları ve hücre bölünmesi üzerinde çevresel kirleticilerin toksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde etkili konsantrasyon değerinin belirlenmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Chauhan et al., 1999; Seth et al., 2007). Etkili konsantrasyon değeri belirlendikten sonra farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks değerlendirilmektedir. Yapılan birçok genotoksisite çalışmalarında, test edilen çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerini saptamak için farklı konsantrasyonların yanı sıra farklı süreler de (4, 6, 8, 12, 24, 48 ve/veya 72 saat) kullanılmaktadır (El-Ghamery et al., 2000; Marcano et al., 2004; Chandra et al., 2005).

Bitkilerin elde edilmesi, taşınması ve saklanması hem kolay hem de ucuzdur. Yüksek yapılı bitkiler kromozomlarının boyutlarından dolayı sitogenetik analizler için uygundur (Fiskesjö, 1985). Ayrıca bitkilerle yapılan testler yüksek duyarlılığa sahiptir ve yeniden elde edilebilir sonuçlar vermektedir. Toksisite, test edilen kimyasalların toksik durumlarını belirlemek için hasar derecesinin kullanıldığı makroskobik parametrelerle (büyüme inhibisyonu gibi) birlikte mutajenezi kanıtlamak için kromozom kırık ve hasarlarının oranlarının belirlendiği mikroskobik parametrelerle de ölçülebilir (Grant, 1982).

Mitotik indeks belirleme çalışmalarında genellikle en yaygın kullanılan bitki *Allium cepa*'dır ve *Allium* testi olarak bilinmektedir. *Allium* testi kimyasallar, kirleticiler ve kontaminantlar için hızlı bir tarama prosedürü olup bitki test sistemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan güvenilir bir test sistemidir. *Allium* testinde gözlenebilen makroskobik ve mikroskobik etkiler arasında iyi bir korelasyon vardır. Yine *Allium* testi ile özellikle memeli test sistemleri karşılaştırıldığında aralarında oldukça iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (El-Shabhaby et al., 2003). Daha önce bu test sistemi ile yapılan çalışmalarda; çevresel kirletici olarak kabul edilen kimyasal maddelerin mitotik indeksi artış ve azalışlar şeklinde etkilediği gösterilmiştir (Pesnya and Romanovsky, 2013; Pandey et al., 2014; Goujon et al., 2014; Rodríguez et al., 2015). Bu etkilenme genellikle mitotik indeks azalmasına yönelik olurken bazı çalışmalarda da artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Kromozom hatalarının indüksiyonunda kullanılan en eski, en basit ve en ucuz yöntem bitki kök uçlarının kullanılması olmuştur. 1975 yılında Kihlman tarafından yapılan bir araştırmada, test

materyali olarak kullanılan *Vicia* kök uçlarının avantajları ve dezavantajları tespit edilmiştir (Kihlman, 1975). *Vicia faba* sadece sitolojik değil, fizyolojik ve radyobiyolojik çalışmalarda da yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. *Vicia faba*'nın kromozom sayısı düşük ve kromozomları kalın olduğundan dolayı bu bitkide sayım yapmak kolaydır (Kihlmann, 1975). Bu sebeple bu bitkiyle önceki yıllarda yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan tüm bu çalışmalarda mitotik indeks kontrole göre değişiklik göstermiştir (B'eraud et al., 2007; Abdul Raof and Siddiqui, 2013; Dhyèvre et al., 2014).

Mitotik indeks *Allium cepa* ve *Vicia faba* dışında diğer birçok bitkide de yaygın olarak uygulanmaktadır. Dong and Zhang (2010) pişirme atıksuyunun genotoksik etkisini *Vicia faba* ve *Hordeum vulgare* üzerinde araştırmış olup mitotik indeksin azaldığını göstermişlerdir. Yine Özkara et al., (2011) Afyon Şeker Fabrikası atıksuyunda *Hordeum vulgare* üzerinde yaptıkları çalışmada mitotik indeksin doza bağlı düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir. Kıran ve Şahin (2005) PbCl<sub>2</sub>'nin farklı konsantrasyonlarının genotoksik etkisini *Lens culinaris* üzerinde incelemiş ve doza bağlı olarak mitotik indekste azalmalar olduğunu tespit etmişlerdir. Li et al., (2008) Çin'de sızıntı atık sularıyla yaptıkları çalışma ile *Triticum aestivum*'da genotoksik hasarı çalışmışlar ve mitotik indeksin konsantrasyon artışına bağlı olarak düştüğünü saptamışlardır. Duquesnoy et al., (2010) *Zea mays* ve *Vicia faba*'da arseniğin genotoksik etkisini araştırmışlar ve mitotik indekste azalmalar saptamışlardır. Ayrıca arseniğin *Pisum sativum*'da da mitotik indeksi düşürdüğü tespit edilmiştir (Dho et al., 2010). Fusconi et al., (2007) yine *Pisum sativum*'da kadmium'un mitotik indeks üzerine etkisini incelemiş ve doza bağlı olarak mitotik indeksi düşürdüğünü belirlemişlerdir. Rodríguez et al., (2015) *Tradescantia pallida* ve *Allium cepa* üzerinde imidacloprid insektisitinin etkisini araştırmışlar ve negatif kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlememişlerdir. Elezaj et al., (2011) *Tradescantia pallida* üzerinde çevresel atıksuların genotoksik etkisini incelemişler ve kontrole göre mitotik indekste azalma tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalar farklı kimyasalların sitotoksisitesinin belirlenmesi için mitotik indeksin temel ve önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

## **2.2. Kromozom Aberasyonları (KA)**

Kromozom aberasyonları, kendiliğinden veya çeşitli mutajenler tarafından indüklenmiş olan kromozomlardaki hem yapısal hem de sayısal değişiklikler olarak karakterize edilmektedir (Evans, 1984;

Preston et al., 1987; Choy, 2001). Kromozom anormallikleri, DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin, kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi de, DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabilmektedir (Savage, 1993; Albertini et al., 2000). Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir (Choy, 2001; Norppa et al., 2006).

Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom aberasyonları kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden olduklarını göstermektedir (Saxena et al., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar kromozom aberasyonlarının genotoksisitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir analizler olduğunu göstermektedir (Rieger et al., 1990; Angelis et al., 2000; Panda et al., 2002).

Kromozom aberasyonları uzun yıllardır bitkilerin üreme başarısı için de bir ölçüt olarak kullanılmakta ve morfolojik ve taksonomik değişiklikler, fertilitite-sterilite ilişkileri, mutasyonlar ve diğer karakteristik özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Grant, 1978).

Bitkilerdeki sitolojik aberasyonlar genetik zarara neden olabilecek çevresel kimyasalların belirlenmesi için mükemmel bir değerlendirme sistemi olarak kabul edilmektedir. Hem mayotik hem de mitotik bölünmeleri değerlendirmede kromozom aberasyonları kullanılabilir. Bitkilerde somatik kromozom aberasyonlarının analizi için genellikle kök uçları ya da polen tüp hücreleri kullanılmaktadır. Mayotik kromozom çalışmalarında ise genellikle polen ana hücreleri kullanılmaktadır. Daha önce yapılan araştırmalar göz önünde bulundurulduğunda bitkilerde yapışıklık, köprü, vagrant kromozomlar, c-mitoz, multipolarlık, fragment ve mikronükleus en sıklıkla gözlenen kromozom aberasyonlarıdır (Arıkan, 2006; Özkara et al., 2011; Özkara et al., 2014). Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan kromozomal aberasyonlar negatif kontrol grubu verileri ile kıyaslanarak kullanılan kimyasalın genotoksisitesi hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Mitotik indeks çalışmalarında olduğu gibi kromozomal aberasyon çalışmalarında da *Allium cepa* yaygın olarak tercih edilen bitkilerdendir. Bu çalışmalarda çevresel kirleticilerden pestisitlere kadar pek çok kimyasal madde değerlendirilmeye alınmıştır. Caritá

and Marin-Morales (2008) bazı azo boyalarının, Yıldız et al., (2009) bakır sülfat ve kobalt klorürün, Saxena et al., (2010) Carbofuran insektisitinin, Türkoğlu (2012) chlorfenvinphos ve fenbuconazole pestisitlerinin, Goujon et al., (2014) sulcotrione pestisitinin, Pandey et al., (2014) bazı gıda koruyucularının *Allium cepa*'da kromozom aberasyonlarını değerlendirmiş ve bu çalışmaların pek çoğunda kromozomal aberasyonlar tespit edilmiştir. Kromozomal aberasyonlar *Allium cepa*'nın yanı sıra diğer bitkilerde de çalışılmaktadır. Rodríguez et al., (2015) imidacloprid insektisitinin genotoksik etkisini *Allium cepa* ve *Tradescantia pallida*'da araştırmış ve kromozomal aberasyonların bu madde ile indüklendiğini tespit etmişlerdir. Srivastava and Mishra (2009) atrazine herbisitinin sitogenetik etkilerini *Allium cepa* ve *Vicia faba*'da çalışmış olup çeşitli kromozomal aberasyonları saptamışlardır. Dho et al., (2010) kromozomal aberasyonları arsenik kimyasalı ile *Pisum sativum* üzerinde çalışmış ve arseniğin farklı konsantrasyonlarının bu aberasyonları indüklemediğini tespit etmişlerdir. Yine Duquesnoy et al., (2010) arseniğin genotoksik etkisini *Vicia faba* ve *Zea mays* üzerinde araştırmışlar ve yüksek dozlarda aberasyonları artırdığını gözlemişlerdir. Çalışılan kimyasal madde ve kullanılan bitkiler değişse de yapılan tüm bu çalışmalar herhangi bir maddenin farklı bitkiler üzerinde genotoksisitesinin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Yapılan tüm bu çalışmalarda mitotik indeks, kromozom aberasyonu ve mikronükleus gibi parametreler bir arada çalışılarak ya da farklı birkaç bitki kombine edilerek çalışmaların güvenilirlikleri artırılmaktadır.

### 2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

KKD analizi, genotoksik maddelerin DNA'da oluşturduğu hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan hızlı, duyarlı ve kantitatif bir ölçüm metodudur. KKD kromozom morfolojisi değişmeksizin, kardeş kromatidler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişi sonucu kromatidlerin karşılıklı farklı boyanması olarak tanımlanmaktadır (Sinyth and Evans 1976, González Borroto et al., 2002, Eisha et al., 2004). Doku tipine, kimyasal maddenin doz oranına ya da diğer faktörlere göre farklılık gösteren KKD, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilmektedir (Stoilov et al., 2002, Helleday, 2003). Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle kromozom DNA'sında meydana gelen ve replikasyon esnasında onarılmayan hatalar KKD'nin ortaya çıkmasına ya da artmasına sebep olmaktadır. KKD



analiz yöntemi ile bir maddenin çok düşük konsantrasyonlarda bile olası mutajenik özelliği kromozom düzeyinde gösterilebilmektedir (González Borroto et al., 2002; Soyöz ve Özçelik, 2003). Bu nedenle pek çok mutajenik ya da kanserojenik etkileri olan maddelerin genotoksik aktivitelerini göstermede duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir (Büssing et al., 1994; Beg et al., 2009; Montoro et al., 2012).

KKD metodu hem bitki hem de memeli hücrelerine kolaylıkla uygulanabilen bir yöntemdir. Bitkilerde KKD testi genellikle düşük kromozom sayısına sahip olan *Vicia faba* ve *Allium cepa* (Cortès and Andersson, 1987; Cortès et al., 1987) gibi bitkilerde daha yaygın kullanılmaktadır ve bu test sistemi ilk defa bitkilerde *Vicia faba*'da uygulanmıştır (Taylor et al., 1957; Taylor, 1958). Aynı zamanda son yıllarda da yine bu bitkiyle yapılan birçok KKD çalışması bulunmaktadır. Dong and Zhang (2010) pişirme atıksularının genotoksitesini *Vicia faba* ve *Hordeum vulgare*'de araştırmışlar ve anlamlı bir şekilde KKD sıklığının arttığını tespit etmişlerdir. Sodium selenite ve sodium biselenite maddelerinin ise genotoksitesini Yi and Si (2007) tarafından *Vicia faba*'da incelenmiş olup her iki maddenin de yüksek dozlarda KKD sıklığını artırdığı saptanmıştır. *Crepis capillaris*'de KKD metodu için oldukça uygun olan bitkilerden biridir (Dimitrov, 1987; Maluszynska, 1990). Gadeva and Dimitrov'un 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada Rubigan, Omite ve Rovral pestisitlerinin genotoksitesini bu bitkide denenmiş olup bu üç pestisit de KKD frekansını indüklediği tespit edilmiştir. Yine Juchimiuk and Maluszynska 2005 yılında yaptıkları çalışmada abiyotik ajanların genotoksitesini bu bitkide araştırmışlar ve KKD sıklığında artış gözlemişlerdir. Bunların yanısıra Pan et al. (2004) alüminyum toksitesini *Hordeum vulgare*'de, Yang et al. 2008 yılında sızıntı sularının etkisini *Triticum aestivum*'da ve Poma et al. (2002) trafiğin yoğun olduğu bölgelerdeki havanın genotoksik etkisini *Zea mays* gibi farklı bitkilerde araştırdıkları KKD çalışmaları da mevcuttur.

#### 2.4. Mikronükleus Sıklığı (MN)

Uzun zamandan beri uygulanan bir sitogenetik teknik olan MN testi, mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal maddelerin meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde güvenli bir metod olarak kullanılabilir (Fenech, 2000). Basit ve hızlı test sistemleri içerisinde yer alan

mikronükleus testi birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (Saleh and Zeytinoğlu, 2001; Akyıl et al., 2014; Akyıl and Konuk, 2014). Hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak çeşitli organizmaların farklı hücrelerinde uygulama alanı bulan mikronükleus yöntemi ile klastojenik (kromozom kırılması, asentrik fragmentlerin ya da multisentrik kromozomların oluşumu) ve anöjenik (kromozomların anafazda kutuplara gidememesi ve iç iplikleri üzerine etkiler) olmak üzere etkiler ortaya çıkarılmaktadır (Fenech, 1993; Müller and Streffer, 1994).

Bitkilerde ilk defa KKD testi 1958 yılında uygulanmış olup 1980'lerden sonra ise KKD ve MN oluşumu genotoksisite testleri arasında yaygın olarak bir arada kullanılmaya başlanmıştır (Taylor, 1958; Ma et al., 1995). MN sayısındaki artış, çeşitli maddelerin hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Zijno et al., 1994). Özellikle çevresel kirleticilerin ve bazı kimyasal maddelerin genotoksisitesinin belirlenmesinde kullanılan mikronükleus testi farklı bitkilerde uygulama alanı bulmuştur. *Tradescantia* ve *Vicia* gibi bitkiler mikronükleus testinde sıklıkla kullanılırken, diğer bitkilerde de çalışmalar yapılmaktadır. *Tradescantia* bitkisinde "stamen hair mutasyonu" ve "mikronükleus test" olmak üzere iki ana test uygulanmakta olup, bu bitki üzerinde mikronükleus testi 1978'den bu yana kullanılmaktadır (Ma et al., 1994; Ma et al., 1994b; Ma et al., 1996). Elezaj et al. (2011) termo elektrik santrallerinin etkilediği suların genotoksisitesini *Tradescantia pallida*'da mikronükleus testi ile araştırmış ve bu suların genotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. Prajapati and Tripathi (2008) Hindistan'ın Varanasi şehrinin hava kirleticilerini *Tradescantia pallida* üzerinde mikronükleus testiyle çalışmış ve trafiğin yoğun olduğu alanlarda mikronükleus sıklığının arttığını belirlemişlerdir. Majer et al. (2002) ise topraklardaki ağır metal kontaminasyonunun *Tradescantia* mikronükleus sıklığı üzerindeki aktivitesini araştırmışlar ve mikronükleus sıklığında artış tespit etmişlerdir. Pereira et al. (2013) Brezilya'da araç kirliliğinin sebep olduğu genotoksisiteyi araştırırken *Tradescantia pallida* bitkisi ile çalışmış olup bu kirliliğin MN sıklığını indüklediğini saptamışlardır. Mikronükleus sıklığının belirlenmesinde birkaç bitki birarada çalışılabilir. Cotelle et al. (1999) kontamine toprakların genotoksisitesini *Allium cepa*, *Vicia faba* ve *Tradescantia* olmak üzere 3 bitki üzerinde araştırmışlar ve her bitkide farklı MN frekansları elde etmişlerdir. Sang and Li (2004)

sızıntı sularının genotoksisitesini *Vicia faba* MN testi ile araştırmışlar ve bu bitkide sızıntı sularının genotoksik bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yine Beraud et al. (2007) kadminyumun yokluğunda indüklenen fitoşelatinlerin genotoksik etkisini *Vicia faba* üzerinde araştırmışlar ve mikronükleus sıklığında artış gözlemlemişlerdir. Bunların dışında Wu et al. (2010) arseniğin etkisini ve Ma et al. (1995) çevresel kirleticilerin etkisini *Allium cepa* ve *Vicia faba* üzerinde; Ocak vd. (2002) Eskişehir Porsuk Çayı'nın genotoksik etkisini *Allium cepa* üzerinde; Pourrut et al. (2011) kurşunun ve Khadra et al. (2012) kontamine toprağın genotoksik etkisini *Vicia faba* üzerinde araştırmışlardır.

Bunların dışında *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* ve *Crepis capillaris*'de mikronükleus testi için tercih edilen bitkiler arasında olup bununla ilgili çeşitli çalışmalarda mevcuttur (Li et al., 2008; Duquesnoy et al., 2010; Han et al., 2011). Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki genotoksik etkinin belirlenmesinde mikronükleus testi sıklıkla tercih edilen parametreler arasındadır.

#### 2.5. Comet Testi (Single Cell Gel Electrophoresis-SCGE)

Comet testi hücrelerin metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (Chetalat et al., 1996; Kasamatsu et al., 1996). Ayrıca DNA sarmal kırılmalarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir metottur (Fairbairn et al., 1995). Bu yöntem iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesme-çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanılarak belirleyebilmektedir (Ostling and Johanson, 1984; Singh et al., 1984). DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü alır. Bu nedenden dolayı hasarlı hücreler Comet olarak adlandırılmaktadır. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir (Ertürk, 2001). Ancak, DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır (Ünal, 1998). Bu nedenle Singh et al. (1988) alkaline comet metodunu tanımlamışlardır. Böylece "tek sarmal kırıkları" denilen ve sadece

alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkânı doğmuştur (Singh et al., 1988; Fidan, 2008).

Diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında; düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek sensitivitesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti Comet yönteminin avantajlarıdır (Tice et al., 2000).

Comet testi ilk olarak hayvan hücrelerinde apoptozisi belirlemek için geliştirilmiş daha sonra ise bu test sistemi bitki hücrelerine de uyarlanmıştır ve bu test tekniği bitkilerin DNA hasarının tespiti için özellikle kök ve yaprak bölgeleri kullanılarak uygulanmaktadır (McKelvey-Martin et al., 1993; Navarrete et al., 1997).

Murali Achary et al. (2008) alüminyumun, Seth et al. (2008) kadmiyumun, Yıldız vd. (2009) bakır sülfat ve kobalt klorürün, Türkoğlu (2012) chlorfenvinphos ve fenbuconazole pestisitlerinin *Allium cepa* üzerinde yaptıkları Comet testi ile uygulanan tüm bu maddelerin DNA hasarını indüklediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Koppen and Verschaeve (1996) ve Pourrut et al. (2011) *Vicia faba*, Rodriguez et al. (2011) *Pisum sativum*, Kwasniewska and arkadaşları (2012) *Crepis capillaris*, Pakova et al. (2006) *Triticum aestivum* ve *Phaseolus vulgaris* gibi farklı bitkiler de Comet testi ile uygulamalar mevcuttur.

#### **2.6. Tunel Test (TdT-mediated dUTP nick end labeling)**

Genotoksisite çalışmalarında apoptozu tanımlamak için kullanılan diğer bir test sistemi de Tunel (TdT-mediated dUTP nick end labeling) olarak bilinen test sistemidir (Havel and Durzan, 1996). DNA zincir kırıkları için işaretlenmiş nükleotitlerin polimerizasyonu terminal deoksinükleotidil transferaz tarafından katalizlenmektedir. DNA kırıklarının belirlenmesinde işaretlenmiş nükleusların kolay taranması ve testin kısa süreli olması bu testin avantajları arasındadır. Tunel testi herhangi bir yeni test ajanının genotoksisitesinin ön değerlendirilmesinde önerilmektedir (Juchimiuk and Maluszynska, 2006).

Bu test sistemi farklı bitkilerde de uygulama alanı bulmuştur. Behboodi and Samadi, 2004 yılında kadmiyumun *Allium cepa* üzerindeki toksisitesini tunel testi kullanarak araştırmışlar ve doza bağlı olarak apoptozisi indüklediğini tespit etmişlerdir. Scaldaferrero et al. (2013) iyonize radyasyonun etkisini tunel testi ile *Capsicum baccatum* var. *pendulum* bitkisinde incelemişler ve DNA kırıklarını

indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca Juchimiuk and Maluszynska (2005) *Crepis capillaris*, Babula et al. (2014) *Lactuca sativa* var. *capitata* ve Dho et al. (2010) *Pisum sativum* gibi farklı bitki türlerinde tunel testini uygulamışlardır.

### 3. SONUÇ

Daha öncede değinildiği üzere gelişen teknolojinin beraberinde getirdiği uygulamalar sebebiyle insanoğlu farkında olmadan çevre ve çevrede yaşamakta olan tüm canlılara zarar vermektedir. Bu sebeptendir ki son yıllarda genetik defektler, genetik hastalıklar ve kanser vakalarının sayısı önemli bir artış göstermiştir. Her ne kadar genetik hastalıkların nedenleri spontan mutasyonlara bağlansa da, çevremizde sürekli maruz kaldığımız fiziksel ve kimyasal ajanların etkileri de göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür. Bu nedenle çevresel kirleticilerin genotoksisite açısından değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Yapılacak olan genotoksisite çalışmaları ile çevresel kirleticilerin taşıdığı riskler belirlenebilmekte ve ciddi genotoksik risk taşıyanların tespit edilerek gerekli önlemlerin alınmasını amaçlayan genotoksisite testlerinin kullanımlarının yaygınlaştırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Bir kimyasalın genotoksik olması o maddenin aynı zamanda kanserojenik etkiye de sahip olabileceğini akla getirmektedir ve yapılan çeşitli çalışmalarda da kanser oluşumu ile genotoksisite arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Vural, 1984). Tüm bu gibi sebeplerledir ki herhangi bir maddenin mutajenitesinin belirlenmesi günümüz biliminin de temel konuları arasında olmaya devam etmektedir. Farklı organizmalar kullanılarak yapılabilen pek çok test sistemi mevcuttur. Bitkisel test sistemleri ise genotoksisite belirleme çalışmalarında pek çok avantajından dolayı halen tercih edilmektedir ve büyük bir öneme sahiptir.

Sonuç olarak; çevresel kirleticilerin ya da herhangi bir kimyasal maddenin genotoksisitesinin belirlenmesinde pek çok farklı test sistemi yine pek çok farklı bitki ile çalışılmaktadır. Çalışmalar, tek bir bitki üzerinde farklı birkaç test sistemi kullanılarak yapılabildiği gibi birkaç bitki üzerinde ya tek test sistemi ya da birkaç test sistemi kombine edilerek sonuçların güvenilirliklerinin arttırılması prensibine dayanarak sürdürülmektedir.

**4. KAYNAKLAR**

- Achary, V.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. 2008. Aluminium Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Root Cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 300-310.
- Akyıl, D., Konuk, M. 2014. Detection of Genotoxicity and Mutagenicity of Chlorthiophos Using Micronucleus, Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchange, and Ames Tests. *Environmental Toxicology*, DOI: 10.1002/tox.21968.
- Akyıl, D., Özkara, A., Erdoğan, S.F., Eren, Y., Konuk, M., Sağlam, E. 2014. Micronucleus Assay In Human Lymphocytes After Exposure to Alloxym Sodium Herbicide *In Vitro*. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-014-9746-8.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemmink, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Water, M.D., Aitio, A. 2000. IPCS Guideline for The Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans, International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research*, 463, 111-172.
- Amer, S.M., Aly, F.A. 1992. Cytogenetic Effects of Pesticides. IV. Cytogenetic Effects of The Insecticides Gardona and Dursban. *Mutation Research*, 279(3), 165-170.
- Angelis, K.J., McGuffie, M., Menke, M. and Schubert, I. 2000. Adaptation to Alkylating Damage in DNA Measured by Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36, 146-150.
- Antonsie-wiez, D., 1990. Analysis of the Cell Cycle in the Root Meristem of *Allium cepa* under the Influence of Leda Krin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 26, 79-96.
- Arıkan, E.S. 2006. Quizalofop-P-Ethyl Herbisitinin *Allium cepa* Kök Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s, Afyonkarahisar.
- Babula, P., Vaverkova, V., Poborilova, Z., Ballova, L., Masarik, M., Provaznik, I. 2014. Phytotoxic Action of Naphthoquinone Juglone Demonstrated on Lettuce Seedling Roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 78-86.

- Barile, F.A. 2008. Principles of Toxicology Testing, CRC Press Taylor & Francis Group, St. John's University, Queens, New York.
- Beg, T., Siddique, Y.H., Ara, G., Gupta, M., Afzal, J. 2009. Protective Action of EGCG Against Anticancer Drugs MMS and CP. *International Journal of Pharmacology*, 6(2), 1-7.
- Behboodi, B.S., Samadi, L. 2004. Detection of Apoptotic Bodies and Oligonucleosomal DNA Fragments in Cadmium-Treated Root Apical Cells of *Allium cepa* Linnaeus. *Plant Science*, 167, 411-416.
- Beraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Ferard, J.F. 2007. Genotoxic Effects and Induction of Phytochelatins in The Presence of Cadmium in *Vicia faba* Roots. *Mutation Research*, 633, 112-116.
- Büssing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A., Schweizer, K. 1994. *Viscum album* L. Extracts Reduce Sister Chromatid Exchanges in Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells. *European Journal of Cancer*, 30, 1836-1841.
- Caritá, R., Marin-Morales, M.A., 2008. Induction of Chromosome Aberrations in the *Allium cepa* Test System Caused by the Exposure of Seeds to Industrial Effluents Contaminated with Azo Dyes. *Chemosphere*, 72, 722-725.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N., Gupta, S.K. 2005. Comparative Biomonitoring of Leachates from Hazardous Solid Waste of Two Industries using *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 347, 46-52.
- Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N., Gupta, S.K. 1999. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. *Environmental Experimental Botany*, 42, 181-189.
- Chetalat, A.A., Albertini, S., Gocke, E. 1996. The Photomutagenicity of Floroquindones in Test for Gene Mutation, Chromosomal Abberation, Gene Conversion and DNA Breakage (Comet Assay). *Mutagen*, 5(11), 497- 504.
- Choy, W.N. 2001. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Marcel Dekker, New York, 29-187.
- Cortès, F., Andersson, H.C. 1987. Analysis of SCEs in *Vicia faba* Chromosomes by a Simple Fluorescent Plus Giemsa Technique. *Hereditas*, 107, 7-13.
- Cortès, F., Escalza, P., Mateos, S., Diaz-Recasens, M. 1987. Factors Affecting the Production of Sces by Maleic Hydrazide in Root-

- 
- Tip Chromosomes of *Allium cepa*. *Mutation Research*, 192, 125-30.
- Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Fe´rard, JF. 1999. Assessment of the Genotoxicity of Contaminated Soil with the *Allium/Vicia*-Micronucleus and the *Tradescantia*-Micronucleus Assays. *Mutation Research*, 426, 167-171.
- Dho, S., Camussoa,W., Mucciarellib, M., Fusconia, A. 2010. Arsenate Toxicity on The Apices of *Pisum sativum* L. Seedling Roots: Effects on Mitotic Activity, Chromatin Integrity and Microtubules. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 17-23.
- Dhyèvre, A., Sophie Foltête, A., Aran, D., Muller, S., Cotelle S. 2014. Effects of Soil pH on the *Vicia*-micronucleus Genotoxicity Assay. *Mutation Research*, 774,17-21.
- Dimitrov, B. 1987. Relationship Between Sister-Chromatid Exchanges and Heterochromatin or DNA Replication in Chromosomes of *Crepis capillaris*. *Mutation Research*,190, 271-276.
- Dong, Y., Zhang, J. 2010. Testing the Genotoxicity of Coking Wastewater using *Vicia faba* and *Hordeum vulgare* Bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 944-948.
- Duquesnoy, I., Champeau, G.M., Evray, G., Ledoigt, G., Piquet-Pissaloux, A. 2010. Enzymatic Adaptations to Arsenic-Induced Oxidative Stress in *Zea mays* and Genotoxic Effect of Arsenic in Root Tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 814-824.
- Eisha, A.A., Marcos, R., Creus, A. 2004. Genotoxicity Studies on the Antimicrobial Drug Sulfamethoxazole in Cultured Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 564, 51-56.
- Elezaj, I.R., Millaku, L.B., Imeri-Millaku, R.H., Selimi, Q.I., Letaj K.R.R. 2011. Acute Genotoxic Effects of Effluent Water of Thermo-Power Plant “Kosova” In *Tradescantia Pallida*. *Journal of Chemical Health Risks* 1(1), 23-28.
- El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I., 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*, 55, 209-215.
- Ertürk Ş. 2001. Sevofloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi ile Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Ve Reaminasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
-



- Evans, H.J. 1984. Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Tests, In. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., (Editors), Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Elsevier Science, Amsterdam, 405-427.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. 1995. The Comet Assay: A Comprehensive Review. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 339(1), 37-59.
- Fenech, M. 1993. The Cytokinesis Blocks Micronucleus Technique. A Detailed Description on The Method and its Application to Genotoxicity Studies in Human Population. Mutation Research, 285, 35-44.
- Fenech, M. 2000. The *In Vitro* Micronucleus Technique. Mutation Research, 455, 81-95.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A. 2007. Mechanism of Micronuclei Formation in Polyploidized Cells of *Allium cepa* Exposed to Trifluralin Herbicide. Pesticide Biochemistry Physiology, 88, 252-259.
- Fidan, A.F. 2008. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 8(1).
- Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* Test as a Standard in Environmental Monitoring. Hereditas, 102, 99-112.
- Fusconi, A., Gallo, C., Camusso, W. 2007. Effects of Cadmium on Root Apical Meristems of *Pisum Sativum* L.: Cell Viability, Cell Proliferation and Microtubule Pattern as Suitable Markers For Assessment of Stress Pollution. Mutation Research, 632, 9-19.
- Gadeva, P., Dimitrov, B. 2008. Genotoxic Effects of the Pesticides Rubigan, Omite and Rovral in Root-Meristem Cells of *Crepis capillaris* L. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 652, 191-197.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R. 2002. Genotoxic Evaluation of the Furylethylene Derivative 1-(5-Bromo-2-Yl)-2-Nitroethene in Cultured Human Lymphocytes. Mutation Research, 519, 179-185.
- Goujon, E., Sta, C., Trivella, A., Goupil, P., Richard, C., Ledoigt, G. 2014. Genotoxicity of Sulcotrione Pesticide and Photoproducts on *Allium cepa* Root Meristem. Pesticide Biochemistry and Physiology, 113, 47-54.

- Gökalp Muranlı, F.D. 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Grant ,W.F. 1992. Cytogenetics Studies of Agricultural Chemicals in Plants in Genetic Toxicology an Agricultural Perspective. Plenum Press, New York, 335-378.
- Grant, W.F. 1978. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. *Environmental Health Perspectives*, 27, 37-43.
- Grant, W.F. 1982. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 99, 273-291.
- Grant, W.F., Salamone, M.F. 1994. Comparative Mutagenicity of Chemicals Selected for Test in The International Program on Chemical Safety Collaborative Study in Plant Systems for the Detection of Environmental Mutagens. *Mutation Research*, 310, 187-209.
- Han, M., Li, G., Sang, N., Dong, Y. 2011. Investigating the Bio-toxicity of Coking Waste Water Using *Zea mays* L. Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1050-1056.
- Havel, L., Durzan, D.J. 1996. Apoptosis in Plants. *Botanica Acta*, 109, 268-77.
- Helleday, T. 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutation Research*, 532, 103-115.
- Juchimiuk, J., Maluszynska, J. 2003. Detection of DNA Fragmentation Caused by Chemical Mutagens Using the TUNEL Test. In: Maluszynska, J., Plewa, M., (Editors). *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health*. Katowice, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, 133-138 pp.
- Juchimiuk, J., Maluszynska, J. 2005. Transformed Roots of *Crepis capillaris*-A Sensitive System for the Evaluation of the Clastogenicity of Abiotic Agents. *Mutation Research*, 565, 129-138.
- Kasamatsu, T., Kohda, K., Kawazoa, Y. 1996. Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Comet Assay. *Mutation Research*, 389, 1-6.
- Khadra, A, Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-Melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guiresse, M., Hafidi, M. 2012. Assessment of the Genotoxicity of Quinolone and Fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* Micronucleus Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 187-192.

- Kihlman, B.A. 1975. Root Tips of *Vicia faba* for the Study of Induction of Chromosomal Aberrations, *Mutation Research*, 31, 401-412.
- Konuk, M., Liman, R., Cigerci, I.H. 2007. Determination of Genotoxic Effect of Boron on *Allium cepa* Root Meristematic Cells. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 73-79.
- Koppen, G., Verschaeve, L. 1996. The Alkaline Comet Test on Plant Cells: A New Genotoxicity Test for DNA Strand Breaks in *Vicia faba* Root Cells. *Mutation Research*, 360, 193-200.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. 2009. *Allium cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application. *Mutation Research*, 682, 71-81.
- Li, G., Yun, Y., Li, H., Sang, N. 2008. Effect of Landfill Leachate on Cell Cycle, Micronucleus, and Sister Chromatid Exchange in *Triticum aestivum*. *Journal of Hazardous Materials*, 155, 10-16.
- Linnainmaa, K., Meretoja, T., Sorsa, M., Vainio, H. 1978. Cytogenetic Effects of Styrene and Styrene Oxide. *Mutation Research*, 58, 277-286.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Cebulska-Wasilewska, A., Cabrera, G.L., Loarca, F., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. 1994. *Tradescantia* Stamen Hair Mutation Bioassay. *Mutation Research*, 310, 211-220.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. 1994b. *Tradescantia* Micronucleus Bioassay. *Mutation Research*, 310, 221-230.
- Ma, T.H., Xu, C., Liao, S., McConnell, H., Jeong, B.S., Won, C.D. 1996. In Situ Monitoring with the *Tradescantia* Bioassays on the Genotoxicity of Gaseous Emissions from a Closed Landfill Site and an Incinerator. *Mutation Research*, 359, 39-52.
- Majer, B.J., Grummt, T., Uhl, M., Knasmüller, S. 2005. Use of Plant Bioassays for the Detection of Genotoxins in the Aquatic Environment. *Acta Hydrochim Hydrobiologia*, 33, 45-55.
- Majer, B.J., Tschirko, D., Paschke, A., Wennrich, R., Kundi, M., Kandeler, E., Knasmüller, S. 2002. Effects of Heavy Metal Contamination of Soils on Micronucleus Induction in *Tradescantia* and on Microbial Enzyme Activities: A Comparative Investigation. *Mutation Research*, 515, 111-124.
- Maluszynska, J. 1990. Chromosomes of *Crepis capillaris* (L.) Waller. In Vivo and In Vitro. *Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego*, Katowice, 147.

- Maluszynska, J., Juchimiuk, J. 2005. Plant Genotoxicity: A Molecular Cytogenetic Approach in Plant Bioassays. *Journal of Plant Genotoxicity*, 56, 177-184.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A., Montiel, X. 2004. Cytotoxicity and Mode of Action of Maleic Hydrazide in Root Tips of *Allium cepa* L. *Environmental Research*, 94, 221-226.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A. 1993. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): A European Review. *Mutation Research*, 288, 47-63.
- Montoro, A., Soriano, J.M., Barquinero, J.F., Almonacid, M., Montoro, A., Verdu, G., Sahuquillo, V., Villaescusa, J.I., Sebastia, N. 2012. Assessment *In Vitro* of Cytogenetic and Genotoxic Effects of Propolis on Human Lymphocytes. *Food Chemical Toxicology*, 50(2), 216-221.
- Mortelmans, K., Rupa, S.D. 2004. Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 379-401.
- Müller, W.U., Streffer, C. 1994. Micronucleus Assays. *Mutation Research*, 5, 1-13.
- Navarrete, M.H., Carrera, P., de Miguel, M., de la Torre, C. 1997. A Fast Comet Assay Variant for Solid Tissue Cells. The Assessment of DNA Damage in Higher Plants. *Mutation Research*, 389, 271-7.
- Ocak, A., Çiçek, A., Zeytinoğlu, H., Mercangöz, A. 2002. Porsuk Çayı Suyunun Bazı Tarım Bitkileri Üzerindeki Ekotoksikolojik Etkileri. *Çevre Koruma Dergisi*, 11, 9-13.
- Olaharski, A., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsbatt, M.E., Guzman, P., Mohar, A., Eastmond, D.A. 2006. Tetraploidy and Chromosomal Instability are Early Events During Cervical Carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27, 3317-43.
- Ostling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S.F., Konuk, M. 2011. Evaluation of Germination, Root Growth and Cytological Effects of Wastewater of Sugar Factory (Afyonkarahisar) using *Hordeum vulgare* Bioassays. *Environmental Monitoring Assessment*, 183, 517-524.

- Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., Erdoğan, S.F. 2014. Potential Cytotoxic Effect of Anilofos by Using *Allium cepa* Assay. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-014-9716-1 2014.
- Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., Erdoğan, S.F., Konuk, M., Sağlam, E. 2014. Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Potential of Pyracarbid by *Allium* test and Micronucleus Assay. *Drug and Chemical Toxicology*, DOI: 10.3109/01480545.2014.966831.
- Pakova, V., Hilscherova, K., Feldmannova, M., Blaha, L., 2006. Toxic Effects and Oxidative Stress in Higher Plants Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their N-Heterocyclic Derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 3238-3245.
- Panda, B.B., Sahu, U.K. 1985. Induction of Abnormal Spindle Function and Cytokinesis Inhibition in Mitotic Cells on *Allium cepa* by the Organophosphorus Insecticide Fensulfotion. *Cytobios*, 42, 147-155.
- Panda, B.B., Sahu, U.K.. 2002. Induction of Abnormal Spindle Function and Cytokinesis Inhibition in Mitotic Cells of *Allium cepa* by the Organophosphorus Insecticide Fensulfothion. *Cytobios*, 42, 147-155.
- Pandey, H., Kumar, V., Roy B.K. 2014. Assessment of Genotoxicity of Some Common Food Preservatives using *Allium cepa* L. as a Test Plant. *Toxicology Reports*, 1, 300-308.
- Pereira, B.B., Ju´nior, E.O.C., Morelli, S. 2013. In Situ Biomonitoring of the Genotoxic Effects of Vehicular Pollution in Uberlandia, Brazil, Using a Tradescantia Micronucleus Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, 17-22.
- Pesnya, D.S., Romanovsky, A.V. 2013. Comparison of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Plutonium-239 Alpha Particles and Mobile Phone GSM 900 Radiation in the *Allium cepa* test. *Mutation Research*, 750, 27-33.
- Poma, A., Arrizza, L., Picozzi, P., Spano, L. 2002. Monitoring Urban Air Particulate Matter (Fractions Pm2.5 And Pm10) Genotoxicity by Plant Systems and Human Cells *In Vitro*: A Comparative Analysis. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22, 271-284.
- Pourruta, B., Jeana, S., Silvestre, J., Pinelli, E. 2011. Lead-Induced DNA Damage in *Vicia faba* Root Cells: Potential Involvement of Oxidative Stress. *Mutation Research*, 726, 123- 128.

- Prajapati, S.K., Tripathi, B.D. 2008. Assessing the Genotoxicity of Urban Air Pollutants in Varanasi City Using *Tradescantia Micronucleus* (Trad-MCN) Bioassay. *Environment International*, 34, 1092-1096.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M. 1987. Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Research*, 189, 157-65.
- Raouf K.M.A., Siddiqui, M.B. 2013. Allelotoxic Effect of Parthenin on Cytomorphology of Broad Bean (*Vicia faba* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12, 143-146.
- Rieger, R., Michaelis, A., Takehisa, S. 1990. On Adaptive Responses in Plant Meristems Cells *in vivo*: Protection Against Induction of Chromatid Aberration. In: G. Obe and A.T. Natarajan (Editors). *Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin, 163-179 pp.
- Rodriguez, E., Azevedo, R., Fernandes, P., Santos, S. 2011. Cr (VI) Induces DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Polyploidization: Aflowcytometric and Comet Assay Study in *Pisum sativum*. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 1040-1047.
- Rodríguez, Y.A., Christofolletti, C.A., Pedro, J., Bueno, O.C., Malaspina, O., Ferreira, R.A.C., Fontanetti, C.S., 2015. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* Bioassays to Evaluate Effects of the Insecticide Imidacloprid. *Chemosphere*, 120, 438-442.
- Saleh, K., Zeytinoğlu, H. 2001. Micronucleus Test in the Peripheral Erythrocytes of *Rana ridibunda* as an Indicator of Environmental Pollution. *Anadolu Üniversitesi, Journal of Science and Technology*, 2, 1, 77-82.
- Sandhu, S.S., de Serres, F.J., Gopalan, H.N.B., Grant, W.F., Velemisky, J., Becking, G.C. 1994. An Introduction and Study Design. *Mutation Research*, 310, 169-73.
- Sang, N., Li, G. 2004. Genotoxicity of Municipal Landfill Leachate on Root Tips of *Vicia faba*. *Mutation Research*, 560, 159-165.
- Savage, J.R.K. 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 22, 198-207.
- Saxena, P.N., Chauhan, L.K.S., Gupta, S.K. 2005. Cytogenetic Effects of Commercial Formulation of Cypermethrin in Root Meristem Cells of *Allium sativum*: Spectroscopic Basis of Chromosome Damage. *Toxicology*, 216, 244-252.

- Saxena, P.N., Gupta, S.K., Murthy, R.C. 2010. Carbofuran Induced Cytogenetic Effects in Root Meristem Cells of *Allium cepa* And *Allium sativum*: A Spectroscopic Approach for Chromosome Damage. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 93-100.
- Scaldeferro, M.A., Prina, A.R., Moscone, E.A., Kwasniewska, J.. 2013. Effects of Ionizing Radiation on *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Solanaceae). *Applied Radiation and Isotopes*, 79, 103-108.
- Seth, C.S., Chaturvedi, P.K., Misra, V. 2007. Toxic Effect of Arsenate and Cadmium Alone and in Combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in Response to Its Accumulation. *Environmental Toxicology*, 22, 539-549.
- Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R. 2008. Genotoxicity of Cadmium on Root Meristem Cells of *Allium cepa*: Cytogenetic and Comet Assay Approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 711-716.
- Singh, N.P., Danner, D.E. Tice, R.R., Brant, L., Schneider, E.L. 1988. Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): Its Importance in Human Biology. *Mutation Research*, 37, 123.
- Singh, S., Lehmann-Grube, B., Goedde, H.W. 1984. Cytogenetic Effects of Paraoxon and Methyl-Parathion on Cultured Human Lymphocytes: SCE, Clastogenic Activity and Cell Cycle Delay. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 54, 195-200.
- Sinyth, D.R., Evans, H.J. 1976. Mapping of Sister Chromatid Exchanges in Human Chromosomes Using G Banding and Autoradiography. *Mutation Research*, 35, 139-154.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., Toman, M.J. 1996. The Evaluation of Waste, Surface and Ground Water Quality using the *Allium* Test Procedure. *Mutation Research*, 368, 171-179.
- Soyöz, M., Özçelik, N. 2003. Ziraat Mücadelede Kullanılan Pestisitlerin Sitogenetik Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi, 10(1), 6-9.
- Srivastava, K., Mishra, K.K. 2009. Cytogenetic Effects of Commercially Formulated Atrazine on The Somatic Cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 8-12.

- Stoilov, L., Wojcik, A.K., Giri, A., Obe, G. 2002. SCE Formation After Exposure of CHO Cells Prelabeled with BrdU or Biotin-Dutp to Various DNA-Damaging Agents. *Mutagenesis*, 17(5), 399-403.
- Taylor, J.H. 1958. Sister-Chromatid Exchanges in Tritium-labeled Chromosomes. *Genetics*, 43, 515-529.
- Taylor, J.H., Woods, P.S., Hughes, W.L. 1957. The Organization and Duplication of Chromosomes As Revealed by Autoradiographic Studies Using Tritium-Labeled Thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 43, 122-128.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartman, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for *in Vitro* and *in Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Mutation Research*, 35, 206-221.
- Türkoğlu, Ş. 2009. Genotoxic Effects of mono-,di-, and Trisodium Phosphite on Mitotic Activity, DNA Content, and Nuclear Volume in *Allium cepa* L. *Caryologia*, 62(3), 171-179.
- Türkoğlu, Ş. 2012. Determination of Genotoxic Effects of Chlorfenvinphos and Fenbuconazole in *Allium cepa* Root Cells by Mitotic Activity, Chromosome Aberration, DNA Content, and Comet Assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 224-230.
- Ünal Y. 1998. Radyoterapi Gören Kanserli Hastalara Ait Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının COMET Assay Tekniği ile Araştırılması, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Vural N. 1984. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No. 56, Ankara, 32-81p.
- Wu, L., Yi, H., Yi, M. 2010. Assessment of Arsenic Toxicity using *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assays. *Journal of Hazardous Materials*, 176, 952-956.
- Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F., Terzi, H. 2009. Determination of Genotoxic Effects of Copper Sulphate and Cobalt Chloride in *Allium cepa* Root Cells by Chromosome Aberration and Comet Assays. *Chemosphere*, 75, 934-938.



- Yi, H., Meng, Z. 2003. Genotoxicity of Hydrated Sulfur Dioxide on Root Tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research*, 537, 109-114.
- Yi, H., Si, L. 2007. *Vicia* Root-Mirconucleus and Sister Chromatid Exchange Assays on The Genotoxicity of Selenium Compounds. *Mutation Research*, 630, 92-96.
- Zijno, A., Leopardi, A., Marcon, F., Crebelli R. 1994. Sex Chromosome Loss and Non-Disjunction in Women: Analysis of Chromosomal Segregation in Binucleated Lymphocytes. *Chromosoma*, 104(6), 461-467.