

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ALLIUM CEPA L.*’ DA KROM (K₂Cr₂O₇)’UN TOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURŞAH OCAK GÜREL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : DOÇ. DR. EMİNE YALÇIN

Haziran 2018

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ALLIUM CEPA* L.'DA KROM ($K_2Cr_2O_7$)'UN TOKSİK
ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurşah OCAK GÜREL

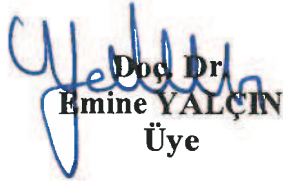
Enstitü Anabilim Dalı

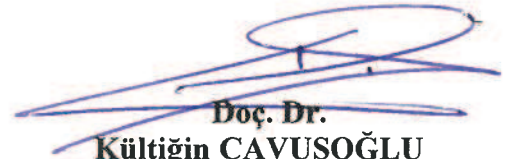
:

BİYOLOJİ

Bu tez 20/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
Kürşat ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Emine YALÇIN
Üye


Doç. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Üye

Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Nurşah OCAK GÜREL

20/06/2018

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince yapmış olduğum bilimsel çalışmalarında, tez çalışmamın her aşamasında eğitim alanındaki ve bilimsel alandaki kıymetli birikimlerini büyük bir fedakarlık ile paylaşan Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Emine YALÇIN'a,

Eğitimim için gerekli tüm bilgi ve becerileri kazanmamda engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU'na,

Eğitimim sırasında ellerini her daim omuzumda hissettiğim, maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen, çalışma hayatımda ciddi emekler sarfeden sevgili annem Rahime OCAK'a ve babam Şahturan OCAK'a, bu süreçte beni her zaman destekleyen, yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Hakan GÜREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Ağır Metaller.....	2
2.2. Krom Kontaminasyonu.....	2
2.3. Bitkilerde Krom Alınımı, Taşınımı ve Birikimi.....	3
2.4. Krom Fitotoksitesi.....	5
2.5. Krom Detoksifikasyonu.....	6
2.6. <i>Allium cepa</i> Testi.....	7
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. $K_2Cr_2O_7$ Uygulaması.....	11
3.2. Çimlenme Yüzdesi, Kök Uzunluğu ve Ağırlık Kazanımı Tespiti.....	11
3.3. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus ve Mitotik İndeks Tespiti.....	12
3.4. Anatomik Hasar Tespiti	13
3.5. İstatiksel Analiz	13
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI	14
4.1. Çimlenme Yüzdesi, Ağırlık Kazanımı ve Kök Ucu Uzunluğu.....	14
4.2. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus ve Mitotik İndeks	16

4.3. Anatomik Hasar.....	20
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	21
KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ	34



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$K_2Cr_2O_7$	: Potasyum Dikromat
PM-ATPaz	: Plazma membran ATPaz
MN	: Mikronukleus
MI	: Mitotik İndeks
SOD	: Süperoksit Dismutaz
PC	: Fitoşelatin
MT	: Metalotiyonin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Bitkilerde krom alınımı ve hücre içi transportu	4
Şekil 2.2. Bitkilerde krom tolerans mekanizmaları	7
Şekil 2.3. Klastojen ve anojenler tarafından indüklenen farklı büyüklükte MN oluşumu.....	10
Şekil 4.1. Kök uzunluğu üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi	16
Şekil 4.2. $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar	19
Şekil 4.3. $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar	20

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. <i>Allium cepa</i> 'da tohum çimlenmesi üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi.....	15
Tablo 4.2. <i>Allium cepa</i> 'da kök uzunluğu (cm) üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi	15
Tablo 4.3. <i>Allium cepa</i> 'da tohum ağırlığı (g) üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi.....	15
Tablo 4.4. <i>Allium cepa</i> 'da $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği MN sıklığı.....	17
Tablo 4.5. <i>Allium cepa</i> 'da MI değeri üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi	17
Tablo 4.6. <i>Allium cepa</i> 'da $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği kromozomal hasarlar	18

***ALLIUM CEPA* L.' DA KROM ($K_2Cr_2O_7$)'UN TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada farklı dozlarda Krom ağır metalinin ($K_2Cr_2O_7$) *Allium cepa* L.'de fizyolojik, sitogenetik ve anatomik etkileri araştırılmıştır. Fizyolojik parametre olarak çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı; sitogenetik parametre olarak mikronukleus sıklığı, kromozomal aberasyonlar ve mitotik indeks araştırılmıştır. $K_2Cr_2O_7$ uygulaması ile çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, ağırlık artışı ve mitotik indeks oranlarının azaldığı, mikronukleus sıklığı ve kromozomal hasarların arttığı belirlenmiştir. En belirgin toksik etki ise 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ uygulanan grupta gözlenmiştir. Mikroskopik incelemeler neticesinde $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği kromozomal hasarlar; kromatinin eşit olmayan dağılımı, fragment, yapışkan kromozom, kromozom köprüsü, c-mitoz, ters kutuplaşma olarak belirlenmiştir. $K_2Cr_2O_7$ uygulamasının kromozomal hasarlar içerisinde en büyük etkinin fragment oluşumu üzerine olduğu tespit edilirken, en az oranda gözlenen kromozom hasarının ise ters kutuplaşma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca $K_2Cr_2O_7$ uygulaması kök ucu meristematik hücrelerinde yassılaşmış hücre çekirdeği, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu ve nekroz şeklinde anatomik hasarlara neden olmuştur. Sonuç olarak $K_2Cr_2O_7$ 'nin *Allium cepa*'da fizyolojik, sitogenetik ve anatomik açıdan ciddi toksik etkilere neden olduğu, bu etkinin de doza bağımlı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa*, $K_2Cr_2O_7$, Kromozomal hasar, Mikronükleus, Mitotik indeks

THE INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS OF CHROMIUM (K₂Cr₂O₇) IN *ALLIUM CEPA* L.

SUMMARY

In this study, physiological, cytogenetic and anatomic effects of Chromium heavy metal (K₂Cr₂O₇) with different doses were investigated in *Allium cepa* L. Germination percentage, root length and weight gain were investigated as physiological parameters; micronucleus frequency, chromosomal aberrations and mitotic index were investigated as cytogenetic parameters. It was determined that germination percentage, root length, weight gain and mitotic index decreased, micronucleus frequency and chromosomal aberrations increased with K₂Cr₂O₇ treatment. The most obvious toxic effect was observed in the group treated with 12.5 mg/L K₂Cr₂O₇ treatment. Unequal distribution of chromatin, fragment, sticky chromosome, chromosome bridge, c-mitosis and reverse polarization were observed as chromosomal aberrations induced by K₂Cr₂O₇. It was determined that the fragment formation was observed in a high rate while reverse polarization was observed in least as chromosome damage after K₂Cr₂O₇ application. In addition, K₂Cr₂O₇ treatment causes anatomical damages in the root tip meristematic cells as flattened cell nuclei, thickening of the cortex cell wall, cell deformation and necrosis. In conclusion, K₂Cr₂O₇ has serious physiological, cytogenetic and anatomic toxic effects in *Allium cepa* and it has been determined that this effect is dose dependent.

Keywords: *Allium cepa*, Chromosomal aberrations, K₂Cr₂O₇, Micronucleus, Mitotic index

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ve hızla artan endüstrileşme, dünya nüfusundaki artışla beraber çevre kirliliği sorununu da ortaya çıkarmıştır. Çevre kirliliği ise canlıların olumsuz yönde etkilenmesine, hastalıkların artmasına ve biyolojik çeşitliliğin azalmasına neden olmuştur. Canlıları olumsuz yönde etkileyen çevre kirliliğinin başlıca unsurunu ağır metaller oluşturmaktadır. Ağır metallerin çevreye kontaminasyonu başlıca madencilik, kentsel veya endüstriyel katı, gaz ve sıvı atıkları, pestisit ve yapay gübre kullanımı, boya sanayisi ve araba egzoz gazlarının salınımı yoluyla oluşmaktadır [1-2].

Ağır metaller arasında yer alan Krom (Cr), dünyada en fazla bulunan elementler arasında yedinci sırada bulunmaktadır ve dünyada yılda yaklaşık 107 ton civarında Cr üretimi gerçekleştirilmektedir. Deri işleme, paslanmaz çelik üretimi, boya pigmenti ve kromik asit üretimi gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılan krom, geniş kullanım alanları nedeniyle ciddi kontaminasyonlara da yol açmaktadır [3-4]. Yüksek toksik özellik sergileyen Cr, canlı organizmalarda hücre membran yapısına zarar vermekte, organel fonksiyonunda bozulmalara ve metabolik yollarda da inhibisyona neden olmaktadır [5]. Cr maruziyeti sonucunda bitkilerde serbest radikaller oluşmakta ve bu radikaller hücrelerde makro moleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır [6]. Cr gibi ağır metaller maruz kalan bitkilerde hücreye giriş, transport, birikim, detoksifikasyon mekanizmaları ile canlıda oluşan toksik etkilerin aydınlatılmasının önemi pek çok kez vurgulanmıştır [7]. Bu çalışmada $K_2Cr_2O_7$ kullanılarak Cr'nin muhtemel toksik etkileri *Allium cepa* testi kullanılarak araştırılmıştır.

A. cepa testi mutajenlerin ve muhtemel kanserojen maddelerin hücreler ve sistemler üzerindeki etkilerinin belirlenmesine olanak sağlayan *in vivo* test yöntemlerinden biridir. *A. cepa* test sisteminde köklerin test edilen madde ile doğrudan temas halinde olması hızlı ve kolay bir şekilde sitotoksikite ile genotoksikitenin belirlenmesini sağlamak ve konsantrasyona bağlı olarak toksisitenin değerlendirilmesine de imkan tanımaktadır. Ayrıca bu test ile mutajenlerin mitoz bölünme, iğ iplikleri ve hücre

yapısı üzerine etkileri de değeriendirilebilmektedir [8]. *A. cepa* testi pek çok araştırımacı tarafından çevre kirliliğinin indikatörü olarak kullanılmaktadır [9,10]. Ağır metallerin, pestisitlerin ve çok çeşitli kirleticilerin toksik etkileri *A. cepa* testi kullanılarak aydınlatılmıştır. Bu çalışmada da Cr metalinin muhtemel toksik etkileri $K_2Cr_2O_7$ uygulanan *A. cepa*'da fizyolojik, anatomik ve sitogenetik parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Fizyolojik etkilerin belirlenmesinde çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı, sitogenetik parametrelerden mitotik indeks, kromozomal anormallik ve mikronukleus oluşumu araştırılmıştır. Ayrıca $K_2Cr_2O_7$ uygulamasının *A. cepa* kök ucu meristematik hücrelerinde oluşturduğu anatomik hasarlarda incelenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, atom numarası 20'den fazla olan ve özgül ağırlıkları 5 gr/cm^3 'den büyük olan elementlerdir. Yeryüzünde doğal olarak bulunan, bozulmayan ya da yok edilemeyen bileşiklerdir. Ağır metal kirliliğinin ve kontaminasyonun en önemli kaynağı endüstriyel kullanımlardır. Endüstrilerde çeşitli amaçlarla kullanılan metallerin, kullanım sonrasında alıcı ortama deşarjı çevreyi ve tüm canlıları büyük bir riske sokmaktadır. Ağır metaller doğal yollarla ya da çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu sularda kirlilik oluşturmaktadır. Doğal yollarla kontaminasyon toprak erozyonu, volkanik aktiviteler ve atmosferik partiküller ile ortaya çıkarken, endüstriyel kontaminasyon ise metal işleme, tekstil ve nükleer sektörlerin faaliyetleri sonucu ortaya çıkmaktadır [11,12]. Her türlü kontaminasyon sonucunda canlılarda çeşitli toksik etkiler meydana gelmektedir. Metaller yüksek konsantrasyonlarda hücre membranına zarar verirler, enzim spesifitesini değıştirirler, hücresel fonksiyonları durdurabilirler ve DNA'nın yapısını bozabilirler. Ağır metalin toksik etkisi metalin türüne, konsantrasyonuna, ortam pH'ına ya da metal iyonlarının çözünürlüğüne göre farklı düzeylerde oluşmaktadır [13].

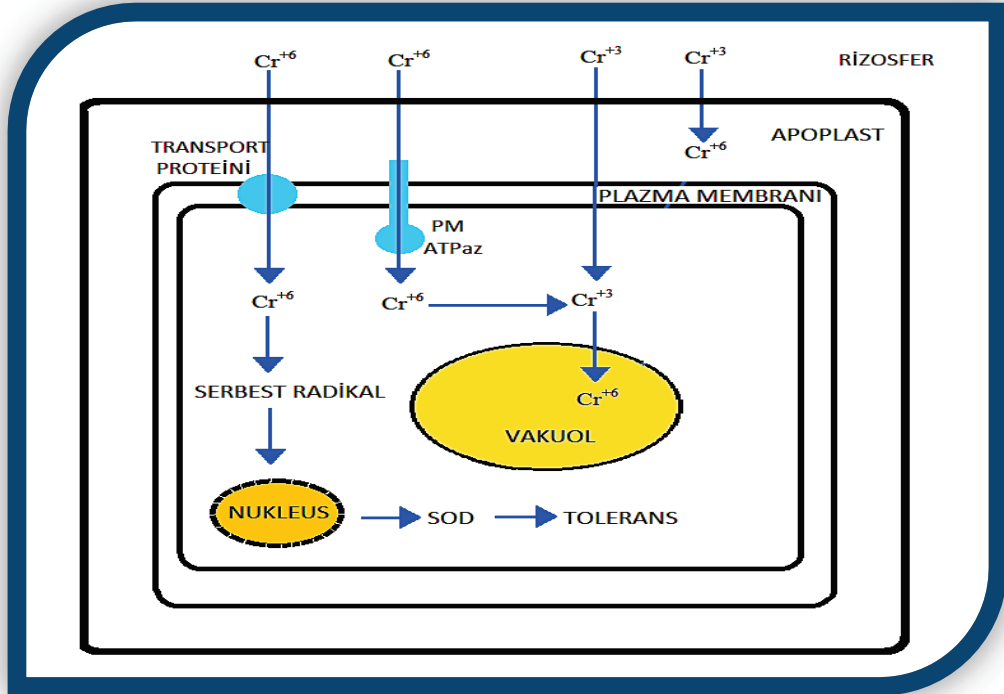
2.2. Krom Kontaminasyonu

Cr, periyodik cetvelin VI B grubunda yer alan bir geçiş metalidir. Dünyada Cr  retimi yılda yaklaşık 107 ton civarındadır [14]. Cr bileşikleri kromik asit üretiminde, paslanmaz elik üretiminde, deri işleme ve boya pigmenti üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [3]. Bu alanlardaki yaygın kullanımı sonucu Cr bileşikleri hızla çevreye kontamine olmaktadır ve özellikle toprak, yüksek derecede Cr tutabilme özelliği ile kirlenmektedir. Toprakta ve sucul ortamlarda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile Cr bileşikleri farklı yapılara dönüşmektedir ve çeşitli yollarla canlılara kontaminasyon gerçekleşmektedir [15]. Cr canlı organizmalara kontamine olduğunda mutasyona sebep olan yüksek toksik özellikte bir metal iyonudur. Hücre zarını sülfat iyonu kanalı ile geçerek ve hücre içerisinde indirgenme reaksiyonlarına katılarak, çeşitli mekanizmalarla reaktif ürünlerin oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşan bu reaktif bileşenler makro moleküllere yapışarak çeşitli hücresel anormalliklere sebep olmaktadır [16]. Cr doğada farklı formlarda bulunmaktadır. Fakat altı değerlikli Cr^{+6} ve üç değerlikli Cr^{+3} türleri daha yaygındır. Cr'nin hem trivalent hem de hekzavalent formları fitotoksiktir [17]. Cr^{+3}  z n rl ğ  oldukça düşüktür ve bu durum çevrede oluşturabileceği toksik etkiyi azaltmaktadır. Fakat yer altı sularında düşük miktarda çözünmesi ve toprak tarafından kuvvetli bir şekilde tutulması toksik etki oluşumuna neden olmaktadır. Güçlü bir oksitleyici ajan ve yüksek çözünür özellikte olan Cr^{+6} ise organik madde içeren ortamlarda Cr^{+3} 'e indirgenmektedir. Asitli ortamlarda hızla indirgenen Cr^{+6} canlı hücrelerde hücre zarından da kolaylıkla geçebilmektedir [18].

2.3. Bitkilerde Krom Alınımı, Taşınımı ve Birikimi

Bitkilerde metallerin alınımı, taşınması ve birikimi bitki türüne ve metal çeşidine göre farklılıklar göstermektedir. Havada gaz halinde bulunan ağır metaller bitkiler tarafından stomalar ile toprak içerisindeki ağır metaller ise kökler aracılığıyla alınmaktadır [19,20]. Bitkiler tarafından Cr alınımı için spesifik bir mekanizma

geliştirilmemiştir ve Cr diğer metallerin hücre içerisine geçişinde kullanılan mekanizmalarla alınmaktadır. Cr'nin hücre içerisine girişte metal iyonlarını taşıyan zar kanallarına bağlanmada diğer metallerle rekabet ettiği bilinmektedir. Cr özellikle kükürt, demir, fosfor taşıyıcılarına bağlanmada bu metallerle yarışmaktadır [21]. Bununla birlikte hücre içerisine geçişte, Cr iyonlarının farklı formda bulunması da önemli bir etkidir. Cr^{+3} hücre içerisine pasif taşıma ile Cr^{+6} ise sülfat translokasyonunda görevli plazma membran ATPaz (PM-ATPaz) ve diğer metallerin taşınmasında görevli transport proteinleriyle aktif bir taşınım ile hücre içerisine taşınmaktadır. Bazı durumlarda Cr^{+3} apoplastta Cr^{+6} 'ya dönüşüp burada kalmaktadır. Hücre içerisine geçen Cr^{+3} yükseltgenme reaksiyonu ile vakuolde Cr^{+6} 'ya dönüşmektedir. Hücre içerisine giren Cr iyonları hücrede serbest radikal oluşumuna ve çeşitli hücresel yapılarda hasara neden olmaktadır. Bu hasar Süperoksit Dismutaz (SOD) gibi çeşitli antioksidan enzimleri vasıtasıyla giderilmekte ve bu etkisizleştirme Cr'a karşı tolerans mekanizmasının oluşumuna katkı sağlamaktadır (Şekil 2.1) [22].



Şekil 2.1 Bitkilerde krom alınımı ve hücre içi transportu

Hücre içerisine giren Cr'nin diğer dokulara taşınması da yine Cr'nin iyonik formundan etkilenmektedir. Bu durumu destekleyen bir çalışmada, CrO_4^{-2} olarak absorbe edilen Cr'nin bazı redüktaz enzimleri ile bitki köklerinde Cr^{+3} formuna dönüştürüldüğü ve diğer dokulara taşındığı rapor edilmiştir [23]. Ayrıca Howe ve ark. [24], Cr'nin köklerden vasküler dokulara girebildiğini, Cr^{+3} ve Cr^{+6} olarak yapraklara daha kolay taşındığını ifade etmişlerdir. Çeşitli yollarla bitkisel dokulara kontamine olan Cr'nin birikimi bitki türüne, dokusuna, organa ve metalin iyonik formuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bazı bitki türlerinde Cr^{+6} birikiminin Cr^{+3} 'e kıyasla daha fazla olduğu [23], bitkilerin kök dokusunda gövde dokusuna göre daha yüksek konsantrasyonlarda Cr^{+6} birikimi olduğu saptanmıştır [25]. Benzer olarak, *Brassica juncea* L. Czern. ve *Salsola kali* Linn. Cr^{+6} birikiminin köklerde gövdeye kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir [26]. Golovatyj ve ark. [27], Cr'un kök dokusunda daha fazla, toprak üstü organlarda ise daha düşük konsantrasyonlarda biriktiğini rapor etmişlerdir. *Phaseolus vulgaris* L. ile yapılan bir çalışmada ise Cr birikiminin tohumlarda %0,1 ve kök dokusunda ise %98 olduğu belirlenmiştir [28].

2.4. Krom Fitotoksitesitesi

Cr, bitkisel metabolik yollarda herhangi bir role sahip değildir ve bu nedenle kromun esansiyel özelliği bulunmamaktadır. Bitkisel dokulara ulaşan Cr iyonları tohum çimlenmesi ve fide gelişimini inhibe etmekte, besin ve su dengesini bozmakta, fotosentetik pigmentlerde bozulmalara ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır [29-31]. Cr stresi, kök hücrelerinde plazmolize ve solmaya neden olarak bitki köklerini etkileyebilmektedir. Cr, amilaz enzimi aktivitelerini inhibe ederek, embriyo ekseninin gelişimi için gerekli olan karbohidratların kullanımını engellemekte ve tohum çimlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Tohum çimlenmesi ilk fizyolojik basamaktır ve ilk basamaktan gelişimin inhibe edilmesi Cr toksitesitesini göz önüne sermektedir [32]. Cr hücrelerde çeşitli metallerle yarışarak bağlanma bölgelerini inhibe etmektedir. Hücre çeperi ve plazma membranında bütünlüğü sağlayan Ca^{+2} gibi katyonlar yerine Cr'nin bağlanması hücre fonksiyonlarında bozulmalara ve anomalilere

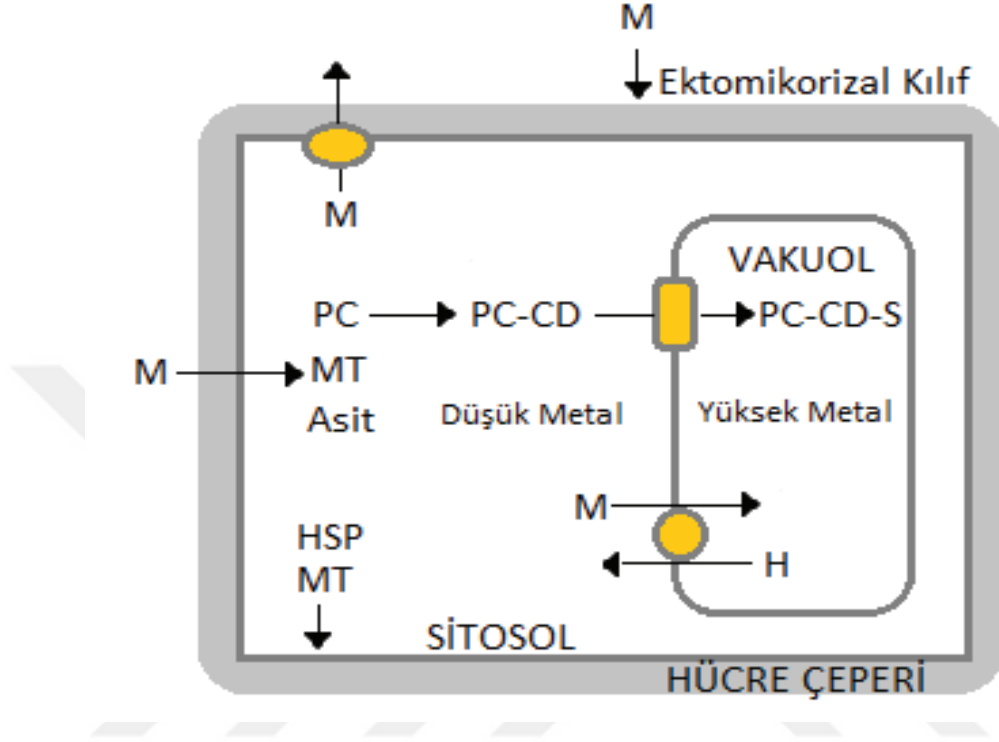
neden olmaktadır [33]. Hücre döngüsü ve hücre bölünmesi bu anormalliklerinden biridir ve hücre bölünmesindeki bir anormallik hücrede pek çok metabolik yolu etkilemektedir. Tohum çimlenmesi, kök uzaması, yaprak gelişimi, fide gelişimi de olumsuz yönde etkilenmektedir. Cr maruziyeti üzerine yapılan bir çalışmada, kök büyümesi ve kök uzamasında inhibisyon olduğu belirlenmiş ve bu inhibisyon hücre döngüsünün uzaması ile açıklanmıştır [3]. Başka bir çalışmada ise Cr etkisi ile kök büyümesinde gözlenen azalmalar kök hücre yüzeylerinin, kök tüylerinin ve epidermal hücrelerin zarar görmesi ile ilişkilendirilmiştir [34]. Cr'nin fitotoksik etkisinde iyonik formlarının etkisi de oldukça önemlidir. Cr^{+6} uygulanan bitkilerde kökler ve gövde dokularının benzer oranda toksisiteden etkilendiği, Cr^{+3} 'ün ise belirgin şekilde kök dokusunda toksik olduğu rapor edilmektedir [35].

2.5. Krom Detoksifikasyonu

Bitkilerin ağır metallere karşı geliştirdiği pek çok tolerans mekanizması mevcuttur. Geliştirilen mekanizmalar benzer olmakla birlikte, metalin ve bitkinin türüne göre de spesifik mekanizmalar da mevcuttur [36-40]. Mikorizalar tarafından köklere metal geçişinin engellenmesi ya da azaltılması, hücre çeperine ya da kök salgılarına metalin bağlanması, plazma membranı tarafından ağır metal geçişinin azaltılması, apoplastta ağır metallerin tutulması, metalotiyonin (MT) gibi bileşiklerle ağır metallerin sitosolde tutunması, vakuollerde fitoşelatin (PC) komplekslerinin oluşumu ve ağır metallerin vakuollerde birikmesi bu tolerans mekanizmalarından bazılarıdır (Şekil 2.2) [22].

Cr maruziyetine karşı da bitkilerde benzer mekanizmalar devreye girmekte, bazı türlerde ise daha spesifik mekanizmalar geliştirilmektedir. Kök salgılarının Cr ile kompleks oluşturarak toksik etkiyi azaltma yolu bazı bitkilerde rapor edilmiştir [41]. Bitkilerde prolin birikiminin stres durumlarında genellikle arttığı bilinmektedir ve Cr stresine maruz kalan *Datura innoxia* P. Miller kök ve yaprak dokusunda prolin

birikiminin Cr konsantrasyonuna bağı olarak arttığı ve Cr'a tolerans mekanizmasının geliştiği rapor edilmiştir [25].



Şekil 2.2 Bitkilerde krom tolerans mekanizmaları

Cr tarafından indüklenen toksisiteye karşı MT-mRNA transkripsiyonunun arttığı [3], metallotiyoninlerin ise Cr iyonlarına bağlanıp, toksik etkisiyi inhibe ederek bitkilerdeki Cr detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [29]. Dixit ve ark. [17], Cr uygulamasının antioksidan enzim düzeylerinde değişimlere neden olduğunu, özellikle 20 μ M Cr(VI) uygulamasının SOD aktivitesini arttırdığını, 200 mikrom Cr(VI) uygulamasının ise SOD aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

2.6. *Allium cepa* Testi

Amaryllidaceae familyası içinde tanımlanan *A. cepa* vasküler ve monokotiledon bir bitkidir. *Allium cepa*, $2n=16$ kromozom sayına sahiptir ve türler arasında farklılık

göstermekle birlikte metafazda en fazla kromozomal uzunluk 43.4 µm ve en kısa kromozomal uzunluk ise 27.9 µm olarak belirlenmiştir [42]. Bununla birlikte *A. cepa*'da poliploidi ile B kromozom türleri de rapor edilmektedir. Literatürde *A. cepa* türlerine ait karyotiplerde bazı farklılıklar gözlenmekte ve bu farklılıkların kromozom kol oranı, sentromerik indeks, translokasyon, delesyon ve inversiyon gibi kromozomal düzenlemelerden kaynaklandığı düşünülmektedir [43,44].

A. cepa kökleri gövdeden tek tek çıkmakta ve nadiren dallanma göstermektedir. Yoğun bir kök kütlesi oluşturan *A. cepa*'da köklerin %75'i toprağın 20-25 cm altında gelişme göstermektedir. Yoğun kök kütlesi çalışmalarda fazla örnek bulma imkânını sağlamaktadır. Köklerin çıktığı nokta ile yaprakların çıktığı alan arasında kalan bölge *A. cepa*'nın gövde dokusunu oluşturmaktadır. Gövde 1-4 mm kalınlığında ve 6-12 mm genişliğinde, rozet şeklindedir ve gövde üzerindeki sürgün sayısı 1 ile 8 arasında değişmektedir. Yapraklar gövdeden, birbiri içine girmiş bir kın şeklinde gelişmekte ve önce dıştaki yapraklar daha sonra içteki yapraklar meydana gelmektedir. 20-30 cm'den başlayarak 50-60 cm'ye kadar boy alabilirler ve en genç yaprak daima en içte yer almaktadır. Yaprak yaşlandıkça besin maddeleri deposu haline gelmekte ve etli bir yapı kazanmaktadır [45].

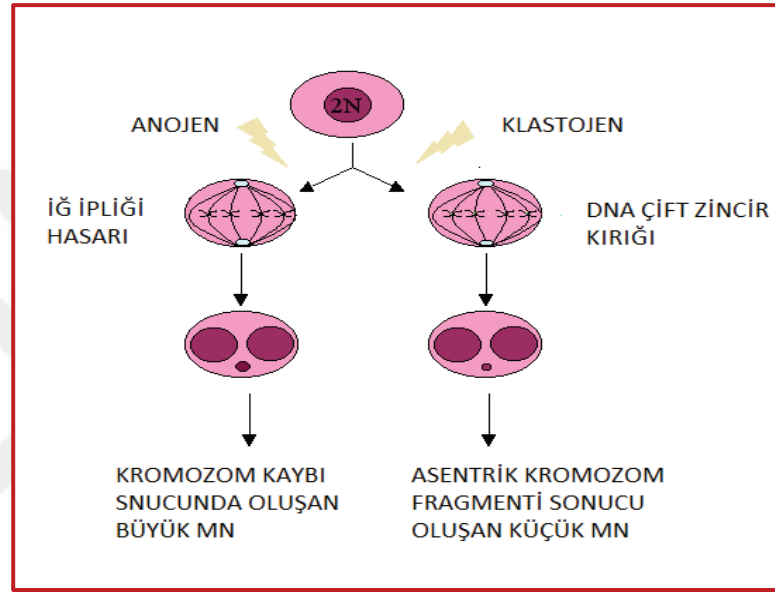
A. cepa testi, pek çok çalışmada çevre kirliliğinin bir biyoindikatörü olarak kullanılmaktadır [9,10]. Bu testin çeşitli kimyasallar tarafından indüklenen kromozomal anormallikleri belirlemede duyarlı bir model olduğu öne sürülmektedir. *A. cepa* testinde yoğun kök dokusunun kimyasallarla direkt temasta olması fazla örnek alma ve hızlı sonuç verme imkânı sağlamaktadır. Bu hızlı ve güvenilir sonuç hayvanları ve bitkileri de kapsayan ökaryotik hücrelerde de kimyasalların potansiyel zararları hakkında ön değerlendirme yapma imkânı tanımaktadır. Kimyasalların neden olduğu yapısal ve sayısal kromozom mutasyonlar da *A. cepa* testi ile belirlenebilmektedir. *A. cepa*'nın vasküler bir bitki olması bu testi, çevresel kirleticilerinin nokta mutasyon dahil tüm sitogenetik etkilerinin belirlenmesinde kullanışlı bir genetik model haline getirmektedir [8]. İlk olarak 1938'de Levan tarafından kullanılan *A. cepa* testi ile mitoz bölünmedeki anormallikler belirlenmiştir [46]. 1985'de Fiskesjö ise polisiklik aromatik hidrokarbonları metabolize eden bir oksidaz sistemine sahip olan *A. cepa*'nın genotoksisite çalışmalarında oldukça

önemli olduğunu vurgulamıştır [47]. İlk çalışma sonrasında Fiskesjö ardışık pek çok çalışma ile *A. cepa* testinin kimyasallar tarafından indüklenen kromozomal hasarlarının ve hücre bölünmesindeki anormalliklerin belirlenmesinde oldukça kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır [48-51]. Genotoksisitenin belirlenmesinde diğer toksisite testleri de yüksek hassasiyettedir. Fakat *A. cepa* testi diğer testlere kıyasla daha hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Ayrıca bu test ile elde edilen sonuçlar diğer toksisite testleri ile yüksek uyumluluk sergilemektedir. İnsan lenfosit hücreleri ve alg hücrelerine uygulanan sitotoksisite testi sonuçları ile *A. cepa* test sonuçları karşılaştırıldığında aynı duyarlılık elde edilmiştir [8]. Rank ve Nielsen [52] kemiricilerde uygulanan genotoksisite testi ile *A. cepa* test sonuçlarının %82 oranında benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Vincentini ve ark. [53] kimyasalların sitotoksik ve genotoksik etkilerinin konsantrasyon ve maruziyet süresine bağlı olarak değerlendirilmesinde *A. cepa* testinin yüksek derecede kabul edilebilirliğine vurgu yapmışlardır. Camparoto ve arkadaşları [54] *A. cepa* testi ve Wistar sıçanların kemik iliğinde yapılan toksisite test sonuçlarının aynı olduğunu rapor etmişlerdir.

A. cepa testinin sunduğu en önemli avantaj ise hazırlanan preparatlar ile tek seferde kromozom anormallikleri, mikronukleus (MN) ve mitotik indeks (MI) belirlenmesine imkân sunmasıdır. MI, hücre proliferasyon durumunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır ve mitozdaki hücre sayısı ile toplam hücre sayısı arasındaki oranı ifade etmektedir. Bu sayede mitotik bölgenin yoğun olduğu dokuların belirlenmesine imkân sağlamaktadır. MI, kök ucundan artan mesafe ile azalmakta ve hücre bölünmesinden hücre uzamasına kadar olan bölgede kademeli bir düşüş anlamına gelmektedir. Kök uçtaki meristematik bölge aktif olarak büyüyen bölgedir ve bu nedenle MI yüksektir. *A. cepa* testi kullanılarak her bir dokudan hazırlanacak ayrı preparatlar ile MI'deki değişimler ve kimyasalların etkisi kolaylıkla incelenebilmektedir [55,56].

A. cepa testi ile kimyasallar tarafından indüklenen MN'ler de kolaylıkla belirlenebilmektedir. bir hücrede MN oluşumu toksik etkiye işaret etmektedir. BU etki kromozom kırıkları, sentromer bölünme hataları ya da iç ipliği deformasyonu ile ilişkilendirilmektedir. *A. cepa* testinde hücrelerdeki MN büyüklüğü incelenerek

kimyasalın anojenik ya da klastojenik etkisi de belirlenebilmektedir. Anojenik etki sentromer bölünme hataları ve iğ iplikçiği bozukluklarına sebep olmaktadır, klastojenler kromozom kırıklarına sebep olmaktadır. Küçük yapıdaki MN'ler anojenik etkiye, daha büyük ölçüdeki MN'ler ise klastojenik etkiye sebep olmaktadır (Şekil 2.3)[57-60].



Şekil 2.3. Klastojen ve anojenler tarafından indüklenen farklı büyüklükte MN oluşumu

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. K₂Cr₂O₇ Uygulaması

Kök ucu preparatlarının hazırlanmasında eşit büyüklükte *A. cepa* tohumları kullanılmıştır. Tohumlar bir kontrol ve üç uygulama grubu olmak üzere toplam dört gruba ayrılmış, seyreltik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmiştir. Her bir gruba ait örnekler 85x100 çapındaki steril beherler içerisinde ve oda sıcaklığında 72 saat süresince çimlenmeye bırakılmıştır. Kontrol grubu (Grup I) tohumlar çeşme suyu ile; Grup II, 2.4 mg/L K₂Cr₂O₇ ile; Grup III, 8.0 mg/L K₂Cr₂O₇ ile; Grup IV ise 12.5 mg/L K₂Cr₂O₇ ile çimlendirilmiştir. Tohumların çimlenme süresince kurumalarını önlemek için grupların kimyasal çözelti ve su miktarları kontrol edilmiştir. Uygulama periyodu sonrasında çimlenmiş kök uçları distile sudan geçirilmiş, ardından standart preparat hazırlama metotlarıyla sitogenetik analizler için hazır hale getirilmiştir [61].

3.2. Çimlenme Yüzdesi, Kök Uzunluğu ve Ağırlık Kazanımı Tespiti

Çimlenmiş tohumların kök ucu uzunlukları radikula oluşumu esas alınıp milimetrik cetvelle ölçülmüştür. Ağırlık kazanımları da uygulama periyodu öncesinde ve sonrasında hassas terazi ile ölçülen tohum ağırlıkları arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir [62].

Uygulama periyodunun diğer bir parametresi olan tohum çimlenme yüzdeleri ise aşağıdaki eşitlik kullanılarak tespit edilmiştir.

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Çimlenen Tohum Sayısı}}{\text{Toplam Tohum Sayısı}} \times 100$$

3.3. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus ve Mitotik İndeks Tespiti

Kromozomal hasarların belirlemek amacıyla her bir gruba ait tohum kök uçlarından yaklaşık olarak 1 cm uzunluğunda kesitler alınıp 2 saat boyunca “Clarke” fiksatorü içinde (3 Etanol/1:Glasial Asetik Asit) fiksasyona tabii tutulmuştur. Fiksasyon sonrasında 15 dakika süreyle %96’lık etanol ile yıkanmış ve +4°C’de %70’lik etanole bırakılmıştır. 60°C’de 17 dakika süreyle 1 N HCl içerisinde hidroliz edilen kök uçları ve 30 dakika süreyle %45’lik asetik asitte bekletilmiştir. Son olarak, kök uçları 24 saat boyunca asetokarmin boyasıyla boyanmış, %45’lik asetik asitte ezme preparatı yapılarak binoküler araştırma mikroskobu yardımıyla fotoğraflandırılmıştır [63].

MN sıklığını tespit etmek için, uygulama gruplarının her birinden toplam olarak 1000 hücre sayılmış ve hücrelerde MN tespiti Fenench ve ark.’nın ölçütleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [64]. Kısaca bir yapının MN sayılabilmesi için;

- i. MN parçaları şekil olarak yuvarlak veya oval olmalıdır.
- ii. MN hücre çekirdeğinden tam olarak ayırt edilebilir olmalı ya da mikronukleer sınır nukleer sınırdan ayırt edilebilmelidir.
- iii. MN parçaları, ana nukleus ile aynı renge boyanmalıdır.

K₂Cr₂O₇’ın *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek için her bir gruba ait MI oranları belirlenmiştir. Bu amaçla kök ucu preparatlarından her grup için 1.000 hücre sayılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak MI oranı belirlenmiştir.

$$\text{Mitotik İndeks \%} = \text{Mitoza Girmiş Hücre/Toplam Hücre Sayısı} \times 100$$

3.4. Anatomik Hasar Tespiti

Anatomik hasar tespiti amacıyla 72 saat boyunca $K_2Cr_2O_7$ 'ın farklı dozları ile muamele edilen *A. cepa* tohumlarına ait kök ucu hücreleri distile suyla yıkanmış ve kök uçlarından enine kesitler alınmıştır. Kesitler metilen mavisiyle boyanmış ve entellen vasıtası ile sürekli preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar mikroskopta büyütülerek incelenmiş ve fotoğraflandırılmıştır [65].

3.5. İstatiksel Analiz

İstatistiksel verilerin analizi için SPSS for Windows V 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA, 2013) paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel farklılıkların değerlendirilmesi One-way ANOVA ve Duncan testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD değerleri olarak verilmiş ve P değeri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Dünya nüfusunun artması, gelişen teknoloji ve hızla artan endüstrileşme kimyasalların kullanımını da arttırmış ve önlemez çevre kirliliğine neden olmuştur. Canlıları olumsuz yönde etkileyen çevre kirliliğinin başlıca unsurunu, pek çok sektörde ve endüstride yaygın bir şekilde kullanılan ağır metaller oluşturmaktadır. Cr bileşikleri de yaygın kullanım alanına sahiptir ve hızla çevreye yayılıp, özellikle toprakta birikerek canlılara kontamine olmaktadır. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada $K_2Cr_2O_7$ 'nin muhtemel toksik etkileri *A. cepa* testi kullanılarak belirlenmiştir. Toksik etkiler fizyolojik, anatomik ve sitogenetik açıdan araştırılmış, fizyolojik etkilerin belirlenmesinde çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı, sitogenetik parametrelerden MI, kromozomal anormallik ve MN oluşumu incelenmiştir. Ayrıca Cr ağır metalinin *A. cepa* dokularında oluşturduğu hasarlarda anatomik kesitler alınarak incelenmiştir.

4.1. Çimlenme Yüzdesi, Ağırlık Kazanımı ve Kök Ucu Uzunluğu

$K_2Cr_2O_7$ 'nin tohum çimlenmesi üzerine etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi Kontrol Grubunda, en düşük ise $K_2Cr_2O_7$ 'nin 12.5 mg/L dozuyla muamele edilen Grup IV'de tespit edilmiştir. Kontrol Grubuna göre; çimlenme yüzdesinin 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$ ile muamele edilen grupta 1.20, 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$ ile muamele edilen grupta 1.56 ve 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ ile muamele edilen grupta ise 2.35 kat azaldığı tespit edilmiştir.

$K_2Cr_2O_7$ 'nin kök uzunluğuna etkisi Şekil 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir. En fazla kök uzunluğu Kontrol Grubunda, en az ise 12.5 mg/L dozunda $K_2Cr_2O_7$ ile muamele edilen Grup IV'de ölçülmüştür. $K_2Cr_2O_7$ uygulaması, Kontrol Grubuna göre kök uzunluğunu Grup II'de 1.57, Grup III'de 2.52 ve Grup IV'de ise 7.27 kat azaltmış, bu azalışlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir.

Tablo 4.1. *Allium cepa*'da tohum çimlenmesi üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Gruplar	Çimlendirilen tohum sayısı	Çimlenen tohum sayısı	Çimlenmeyen tohum sayısı	Çimlenme yüzdesi (%)
Grup I	50	47	3	94
Grup II	50	39	11	78
Grup III	50	30	20	60
Grup IV	50	20	30	40

Tablo 4. 2. *Allium cepa*'da kök uzunluğu (cm) üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

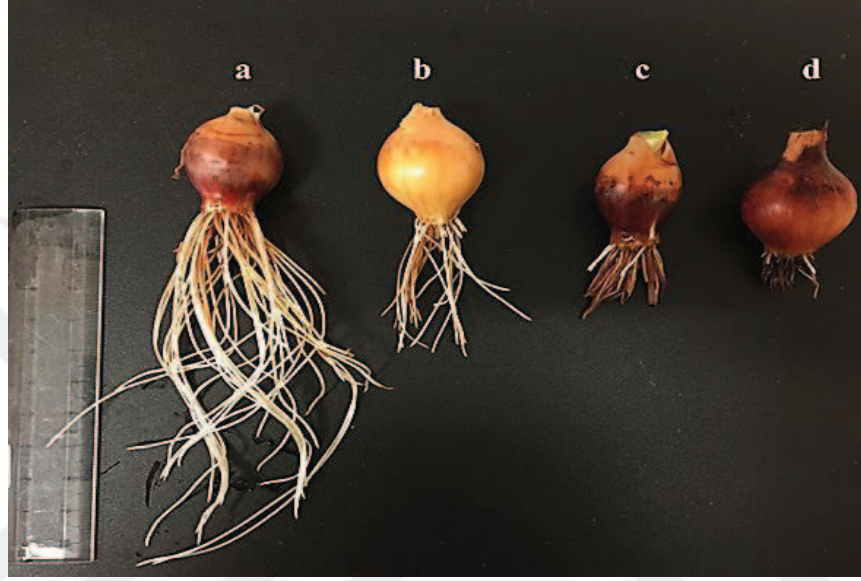
Gruplar	Minimum kök uzunluğu	Maksimum kök uzunluğu	Ortalama kök uzunluğu
Grup I	10,60	17,40	14,61±2,22 ^a
Grup II	6,40	12,20	9,28±1,71 ^b
Grup III	4,10	8,40	5,79±1,53 ^c
Grup IV	1,10	4,80	2,01±1,19 ^d

Tablo 4.3. *Allium cepa*'da tohum ağırlığı (g) üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Gruplar	Başlangıç	Son	Ağırlık Artışı
Grup I	8,81±1,37 ^d	17,30±1.61 ^a	+8,49
Grup II	8,88±1,34 ^d	14,50±2,43 ^b	+5,62
Grup III	8,99±0,58 ^d	12,04±2,33 ^c	+3,05
Grup IV	8,92±0,97 ^d	9,93±1,87 ^d	+1,01

*Grup I: Kontrol, Grup II: 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup III: 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup IV: 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir (n=10). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “One-ay” ANOVA varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

$K_2Cr_2O_7$ 'nin tohumlardaki ağırlık artışı üzerine etkisi Tablo 4.3'de gösterilmiştir. En fazla ağırlık artışı 8.49 gramla Kontrol Grubu tohumlarda, en az ise 1.01 gramla $K_2Cr_2O_7$ 'nin 12.5 mg/L dozuyla muamele edilen Grup IV'de gözlenmiştir. Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında, ağırlık kazanımı $K_2Cr_2O_7$ ile muamele edilen Grup II, III ve IV'de sırasıyla 1.51, 2.78 ve 8.41 kat azalmış, bu azalışlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Kök uzunluğu üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi a: Grup I: Kontrol, b: Grup II: 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$, c: Grup III: 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$, d: Grup IV: 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$

4.2. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus ve Mitotik İndeks

$K_2Cr_2O_7$ 'nin kök ucu hücrelerinde teşvik ettiği MN oluşumu Şekil 4.2 ve Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Kontrol Grubu kök ucu hücrelerinde ortalama 0.10 oranında MN oluşumu belirlenirken, $K_2Cr_2O_7$ uygulanan kök ucu hücrelerinde ise uygulanan $K_2Cr_2O_7$ dozuna bağlı olarak MN sayısında artış gözlenmiştir. $K_2Cr_2O_7$ 'nin 2.4 mg/L dozuyla muamele edilen Grup II'de ortalama 18.60, 8.0 mg/L dozuyla muamele edilen Grup III'de ortalama 48.70 ve 12.5 mg/L dozuyla muamele edilen Grup IV'de ise ortalama 60.10 oranında MN sayılmıştır. Kontrol Grubuna göre; MN sayısında gözlenen bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) da tespit edilmiştir.

Kök uçtaki meristematik bölge aktif olarak büyüyen bölgedir ve bu nedenle MI yüksektir. Bu nedenle her bir gruba ait *A. cepa* kök ucu hücrelerinden hazırlanan preparatlarda MI oranları belirlenmiştir. $K_2Cr_2O_7$ 'nin hücre bölünmesi ve sitotoksitenin indikatörü olarak kullanılan MI değeri üzerine etkisi Tablo 4.5.'de gösterilmiştir. Mikroskopik sayımlar sonucunda, en fazla MI yüzdesi Kontrol Grubu tohumların kök ucu hücrelerinde, en düşük ise $K_2Cr_2O_7$ 'nin 12.5 mg/L dozuyla muamele edilen Grup IV'deki kök ucu hücrelerinde tespit edilmiştir. $K_2Cr_2O_7$ doz artışı ile birlikte kök uçlarında bölünme oranlarının azaldığı da belirlenmiştir. Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında, $K_2Cr_2O_7$ uygulaması MI yüzdesini Grup II'de 1.11, Grup III'de 1.41 ve Grup IV'de ise 1.88 kat azaltmış, bu azalışlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) gözlenmiştir.

Tablo 4.4. *Allium cepa*'da $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği MN sıklığı

Gruplar	Hesaplanan hücre sayısı	Minimum (MN)	Maksimum (MN)	Ortalama (MN)
Grup I	10,000	0	1	0,10±0,32 ^d
Grup II	10,000	13	28	18,60±4,58 ^c
Grup III	10,000	40	60	48,70±6,13 ^b
Grup IV	10,000	52	70	60,10±5,84 ^a

Tablo 4.5. *Allium cepa*'da MI değeri üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Gruplar	Analiz edilen hücre sayısı	Mitotik İndeks (MI)	Yüzde (%)
Grup I	10,000	870,60±34,93 ^a	8,70
Grup II	10,000	783,30±32,02 ^b	7,83
Grup III	10,000	617,10±67,71 ^c	6,17
Grup IV	10,000	462,90±50,68 ^d	4,62

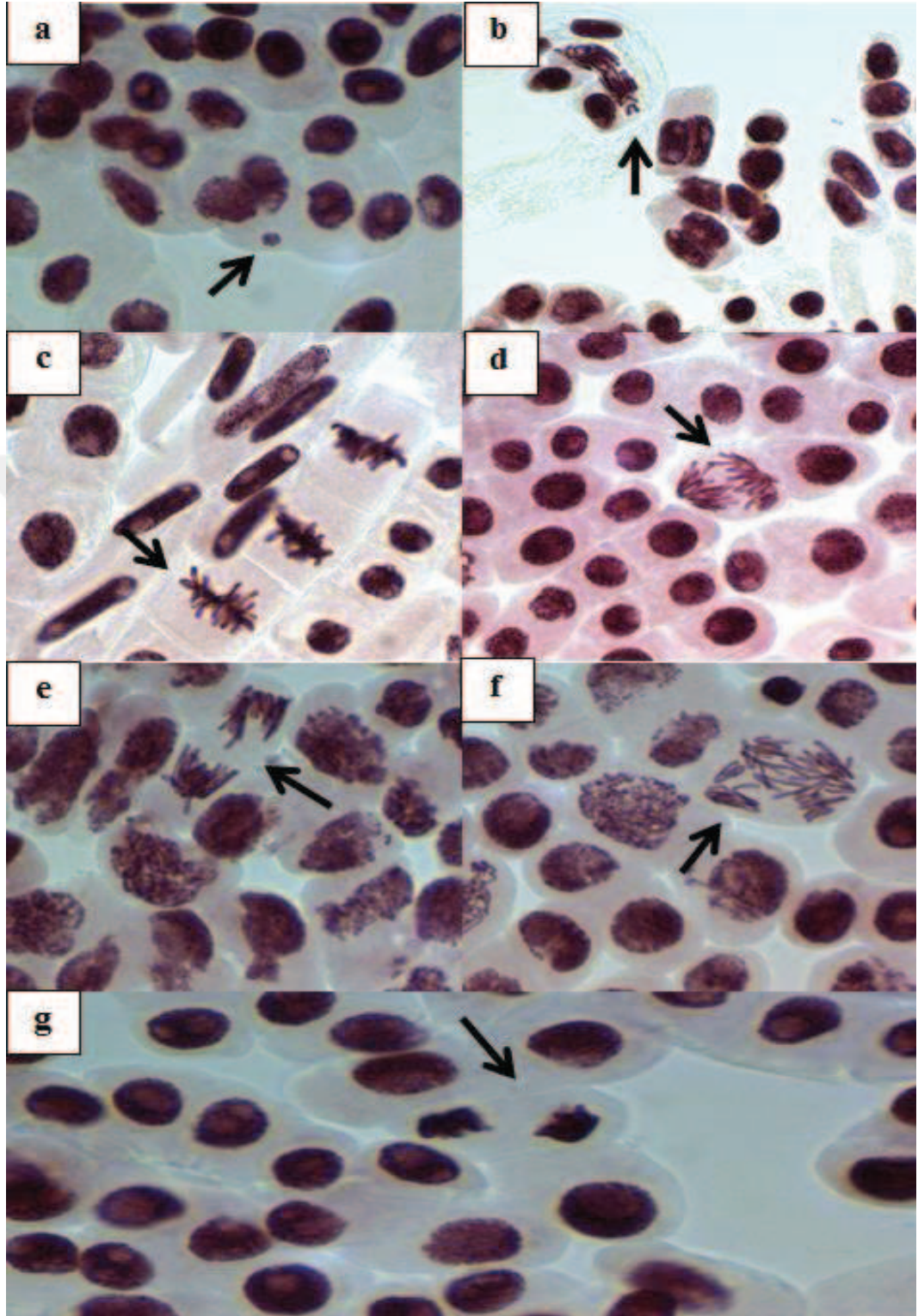
*Grup I: Kontrol, Grup II: 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup III: 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup IV: 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir (n=10). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem "Duncan" testini takiben "One-ay" ANOVA varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir.

A. cepa kök ucu hücrelerinde $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar Şekil 4.2 ve Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda, Kontrol Grubu tohumların kök ucu hücrelerinde birkaç yapışkan kromozom ve köprü dışında her hangi bir hasar gözlenmemiştir. Kontrol grubunda gözlenen bu hasarların da oldukça düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. $K_2Cr_2O_7$ uygulanan gruplarda ise farklı türde ve farklı oranlarda kromozom hasarları tespit edilmiştir. Gruplarda en fazla fragment oluşumuna rastlarken, en düşük düzeyde ise ters kutuplaşma gözlemiştir. Kromozom hasarlarının görülme sıklığı fragment>yapışkan kromozom>köprü>kromatinin eşit olmayan dağılımı>c-mitoz>ters kutuplaşma şeklinde sıralanmaktadır. Bununla birlikte $K_2Cr_2O_7$ dozunun artması ile birlikte tüm hasarların görülme sıklığı da artmıştır. Gözlenen hasar sayılarındaki bu artışın, istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) da belirlenmiştir.

Tablo 4.6. *Allium cepa*’da $K_2Cr_2O_7$ ’nin teşvik ettiği kromozomal hasarlar

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
FRG	0.00±0.00 ^d	25.10±4.82 ^c	54.20±6.97 ^b	70.40±6.11 ^a
YK	0.20±0.42 ^d	19.60±4.33 ^c	40.80±4.98 ^b	53.30±5.64 ^a
K	0.10±0.32 ^d	15.80±4.32 ^c	23.50±2.92 ^b	41.90±6.38 ^a
KED	0.00±0.00 ^d	11.90±2.73 ^c	18.00±4.37 ^b	32.80±4.66 ^a
CM	0.00±0.00 ^d	8.00±2.36 ^c	14.70±3.80 ^b	24.80±5.98 ^a
TK	0.00±0.00 ^d	4.60±2.07 ^c	7.90±2.92 ^b	14.10±3.57 ^a

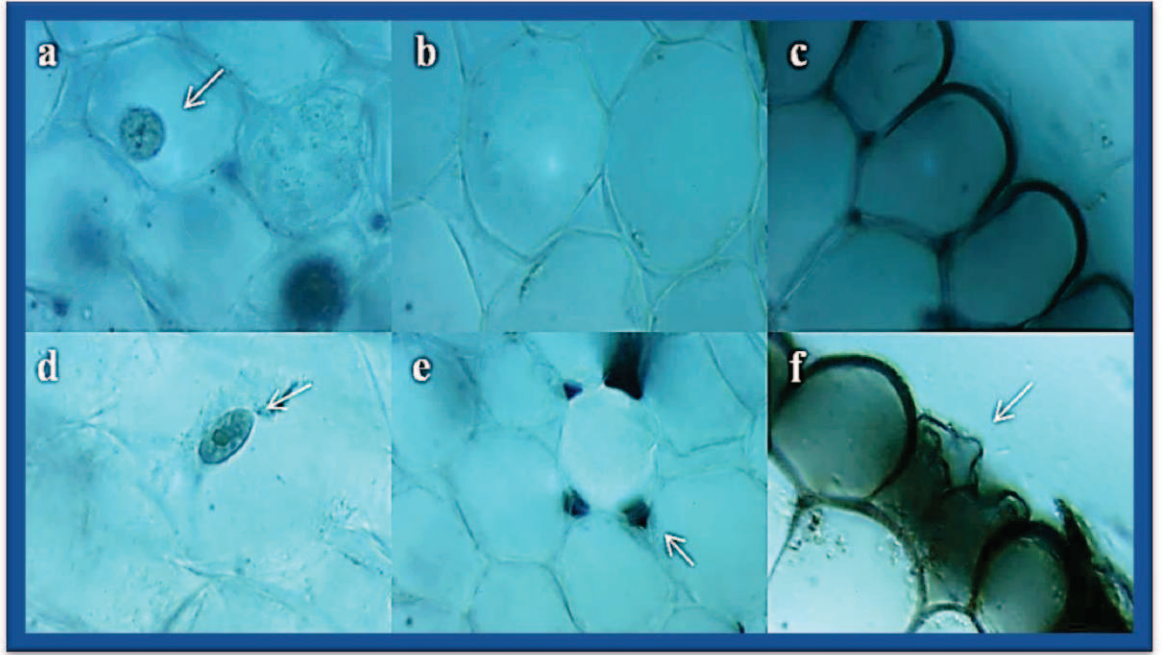
Grup I: Kontrol, Grup II: 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup III: 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$, Grup IV: 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$. Kromozomal hasarlar için, her bir gruptaki her bir kök ucundan 100 hücre, toplamda ise 1.000 hücre analiz edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir (n=10). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “One-ay” ANOVA varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0.05$). (FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, K: köprü, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, CM: C-mitoz, TK: ters kutuplaşma).



Şekil 4.2. $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar (a: MN, b: fragment, c: yapışkan kromozom, d: köprü, e: kromatinin eşit olmayan dağılımı, f: C-mitoz, g: ters kutuplaşma)

4.3. Anatomik Hasar

$K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Kontrol Grubu tohumların kök ucu meristematik hücrelerinde her hangi bir hasar gözlenmezken, Cr uygulanan gruptaki tohumların kök ucu hücrelerinde ise yassılaştırmış hücre çekirdeği, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu ve nekroz şeklinde anatomik hasarlar gözlenmiştir.



Şekil 4.3. $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar (a: hücre çekirdeğinin olağan görünümü, b: korteks hücrelerinin olağan görünümü, c: epidermis hücrelerinin olağan görünümü, d: yassılaştırmış hücre çekirdeği, e: korteks hücre çeperinde kalınlaşma, f: epidermis hücre deformasyonu ve nekroz)

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Krom, canlı organizmalara kontamine olduğunda mutasyona sebep olan yüksek toksik özellikte bir ağır metal iyonudur. Kromik asit üretiminde, paslanmaz çelik üretiminde, deri işleme ve boya pigmenti üretimi gibi pek çok alanda kullanılmakta ve kontaminasyon sonucunda toprağı, suyu ve havayı ciddi biçimde kirletmektedir. Bu çalışmada, Cr ağır metalinin muhtemel toksik etkileri *A. cepa*'da fizyolojik, anatomik ve sitogenetik parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Fizyolojik etkilerin belirlenmesinde çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı, sitogenetik parametrelerden MI, kromozomal anormallik ve MN oluşumu araştırılmıştır. Ayrıca $K_2Cr_2O_7$ uygulamasının *A. cepa* dokularında oluşturduğu anatomik hasarlarda kök ucundan alınan kesitlerle incelenmiştir.

Fizyolojik parametrelerden çimlenme yüzdesi, ağırlık artışı ve kök uzunluğundaki değişimler araştırılmış ve her bir parametrede $K_2Cr_2O_7$ doz artışına bağlı olarak önemli değişimler olduğu belirlenmiştir. Çimlenme yüzdesinin kontrol grubu ve $K_2Cr_2O_7$ uygulanan Grup II, III ve IV'de sırasıyla %94, %78, %60 ve %40 olduğu belirlenmiştir. Kısaca $K_2Cr_2O_7$ uygulamasının *A. cepa* tohumlarında çimlenme yüzdesini azalttığı görülmüştür. Literatürde de benzer şekilde Cr uygulamasının bitkilerde çimlenme oranını azalttığı rapor edilmektedir [30,31]. Panda ve arkadaşları [66] Cr uygulanan *Vigna radiata* (L.) Wilczek'da çimlenme oranının azaldığını rapor etmişlerdir. Çimlenme oranındaki bu azalma Cr'nin bitkilerde amilaz enzimlerinin aktivitesini inhibe ederek ya da azaltarak embriyo gelişimi için gerekli olan glikoz kullanımını sınırlaması ve tohum çimlenmesini azaltması ile açıklanabilir [66]. Peralta ve ark. [67] çimlenme olayının bir tohumun gelişimindeki ilk süreç olması nedeniyle bitkilerin Cr toleransı çalışmalarında bir indikatör olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

Tohumlarda ağırlık artışı incelenen diğer fizyolojik parametrelerdendir ve tohumlarda ağırlık artışı kontrol grubu ve $K_2Cr_2O_7$ uygulanan Grup II, III ve IV'de sırasıyla 8.49 g, 5.62 g, 3.05 g ve 1.01 g olarak belirlenmiştir. En düşük ağırlık artışı en yüksek $K_2Cr_2O_7$ (12.5 mg/L) uygulanan grupta gözlenmiştir. Gupta ve ark. [68] Cr (VI) uygulanan *Brassica juncea* L.'da taze ağırlık oranının önemli düzeyde azaldığını rapor etmişlerdir. Bitkisel dokularda yaş ya da taze ağırlık kadar kuru ağırlık da Cr toksisitesinden etkilenmektedir. Zurayk ve ark [69] *Portulaca oleracea* L. bitkisinde Cr (VI) birikiminin kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Cr'nin ağırlık artışı üzerine bu azaltıcı etkisi, kloroplast ve mitokondride yapısal hasarların oluşması buna bağlı olarak işlevlerinin inhibe olması ve ağırlık artışının dolaylı olarak etkilenmesi ile açıklanabilir. Bununla birlikte, bitkilerde Cr maruziyeti klorofil, karotenoid, karbon bileşiklerinin sentez mekanizmalarını inhibe ederek de ağırlık artışını azaltmaktadır [17,70].

Bir bitkinin toprağa tutunması ve beslenmesi için köklerin sağlıklı bir gelişim göstermesi gerekmektedir. $K_2Cr_2O_7$ 'nin *A. cepa*'da kök gelişimine etkisi radikula ölçümü yapılarak araştırılmış ve sonuçta kontrol grubuna göre kök uzunluğunun Grup II'de 1.57, Grup III'de 2.52 ve Grup IV'de ise 7.27 kat azaldığı belirlenmiştir. Shanker ve ark. [3], Cr'nin ağır metaller arasında kök uzunluğu üzerinde yüksek toksik etkiye sebep olduğunu vurgulamıştır. Pandey ve ark. [30], bezelye bitkilerinde 200 μ M Cr(VI) uygulamasının kök uzunluğunda %18 azalmaya neden olduğunu rapor etmiştir. Rout ve ark. [71] 100 μ M Cr(VI) Cr stresi altındaki pirinç fidelerinin kök uzunluğunun, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Cr uygulaması ile kök uzamasında gözlenen azalma kök hücrelerinin bölünmesi ve uzamasındaki inhibisyonu veya hücre döngüsünün bozulması ile ilişkilendirilebilir [3]. Ayrıca Cr uygulaması, su dengesini bozarak kök hücrelerinde plazmolize, kök yüzeyinin zarar görmesine, kök tüylerinin ve epidermal hücrelerin deformasyonuna neden olarak kök uzamasını ve buna bağlı olarak bitki büyümesini de engellemektedir [32,34].

$K_2Cr_2O_7$ 'nin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde genotoksik etkisi kromozomal hasar boyutunda incelenmiştir. Gruplara uygulanan $K_2Cr_2O_7$ farklı türde kromozomal hasar oluşumuna neden olmuş ve fragment, yapışkan kromozom, köprü, kromatinin eşit olmayan dağılımı, c-mitoz ve ters kutuplaşma hasarlarına rastlanmıştır. $K_2Cr_2O_7$ dozunun artması ile birlikte tüm hasarların görülme sıklığı da artmıştır. Benzer şekilde, Gupta ve arkadaşları [72] *A. cepa*'da 48 ve 168 saat süre ile Cr uygulamasının yüksek sıklıkta fragment ile kromozom kırıklarına ve daha düşük düzeyde ise diğer kromozomal hasarlara neden olduğunu rapor etmişlerdir. Fang ve arkadaşları [73] trivalent ve hekzavalent Cr'nin maya hücrelerinde ciddi mutasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer çalışmalarda da, Cr'a maruz kalan hücrelerde DNA-Cr komplekslerinin oluştuğu ve bu oluşumun kromozomlarda anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir [74-76]. Hücrelerde nukleusa ulaşan Cr, DNA-fosfat omurgası ile elektrostatik etkileşime girmekte, fosfat grupları ile kovalent bağ oluşturmakta, kırılmalara ve DNA degradasyonuna neden olmaktadır [77,78]. Cr'nin bu etkileri DNA üzerindeki direkt etkileridir. Bunun dışında Cr, DNA üzerinde dolaylı etkilere de sahiptir. Cr stresine maruz kalan bitkilerde, serbest radikaller oluşmakta, özellikle oluşan singlet oksijen, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali DNA yapısında ve DNA ile ilişkili proteinlerde oksidatif hasara neden olmaktadır [6]. Cr'nin DNA üzerindeki hem direkt hem de dolaylı etkileri sayısal ve yapısal mutasyonlara ve kromozomal anormalliklere sebep olmaktadır. Bu çalışmada, $K_2Cr_2O_7$ uygulaması sonrasında *A. cepa* kök ucu hücrelerinde gözlenen kromozomal anormallikler Cr'nin bu etkileri ile açıklanabilir.

Sentromer bölünme hataları, iğ iplikçiği bozuklukları ve kromozom kırıklarından köken alan MN oluşumları, sitotoksisitenin önemli bir indikatörüdür [59,60]. $K_2Cr_2O_7$ 'nin kök ucu hücrelerinde teşvik ettiği MN sıklığının uygulama dozuna bağlı olarak değiştiği, en yüksek MN ise Grup IV'de ortalama 60.10 oranında belirlenmiştir. Benzer şekilde, Gupta ve arkadaşları [72], *A. cepa* tohumlarında 168 saat süre ile 4.0 mg/L Cr çözeltisi uygulamasının yüksek oranda MN oluşumuna neden olduğunu tespit etmişlerdir. MN oluşumu hücrelerde toksisitenin göstergesidir ve DNA hasarından kaynaklanmaktadır. Hücre bölünmesi anormallikleri ya da iğ ipliği hasarı sonucunda kromozomal yapılar serbest kalmakta ve bir nükleoplasma ile

sarılarak ana nukleusa yakın MN meydana gelmektedir. Bu tür MN oluşumları kromozomal yapıdan oluştuğu için büyük çapa sahiptir. Bazı mutajenik ve karsinojenik ajanlar kromozomlarda kırıklara sebep olmakta ve bu kırıklar MN oluşumuna yol açmaktadır. Bu yolla oluşan MN'ler daha küçük çapa sahiptir. Hem küçük hem büyük yapıdaki MN'ler hücrede toksisitenin varlığına işaret etmektedir [79-83]. Bu çalışmada, *A. cepa* kök ucu hücrelerinde gözlenen MN oluşumu $K_2Cr_2O_7$ uygulamasının kromozom kırığı, iğ ipliği hasarı ve mitotik anormalliklere sebep olabileceğine işaret etmektedir.

MI, bir hücrenin proliferasyon durumunun bir göstergesidir ve özellikle kök dokusuna ait meristematik bölgede MI oldukça yüksektir. Bu çalışma kapsamında da *A. cepa* kök ucu hücrelerinden hazırlanan preparatlarda MI oranları belirlenmiştir. Kontrol grubunda %8.7, Grup II'de % 7.83, Grup III'de %6.17 ve Grup IV'de %4.62 olarak bulunan MI yüzdelerinin $K_2Cr_2O_7$ doz artışı ile azaldığı tespit edilmiştir. Gupta ve arkadaşları [72] 4.0 mg/L Cr uygulamasının *A. cepa*'da MI'i %79.71 oranında azalttığını rapor etmişlerdir. Cr uygulaması sonrasında MI de gözlenen azalmalar, Cr'nin oluşturduğu stresin kök hücrelerinin bölünmesini inhibe etmesi ve hücre döngü süresini uzatması ile açıklanabilir. Hücre siklusunun uzaması hücre proliferasyonunu ve MI oranını azaltmaktadır [3].

$K_2Cr_2O_7$ uygulaması *A. cepa* kök ucu hücrelerinde yassılaşmış hücre çekirdeği, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu ve nekroz şeklinde anatomik hasarlara sebep olmuştur. Bu anatomik değişimlerden bazıları hücre tolerans mekanizması ile ilişkiliyken, bazı anatomik değişimler ise toksisiteden ileri gelmektedir. Bitkiler metallerin toksik etkisini tolere edebilmek için dokularda biriktirme, detoksifikasyon sistemini aktive etme, atılımını artırma, diğer dokulara geçişi azaltmak için korteks hücrelerinin kalınlaşması, hücre duvarında suberin akümüasyonu gibi bazı mekanizmalar geliştirmiştir [84,85]. Bu tolerans mekanizmaları, özellikle düşük konsantrasyonlarda maruziyette gerçekleşirken, anatomik değişime neden olmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonda ise tolerans mekanizmaları da toksisiteye engel olamamakta ve anatomik hasar oluşmaktadır. Bu çalışmada, özellikle gözlenen hücre çeperinde kalınlaşma anatomik değişime işaret

etmektedir ve *A. cepa* $K_2Cr_2O_7$ toksisitesine karşı tolerans geliştirmektedir. Özellikle yüksek konsantrasyonda $K_2Cr_2O_7$ uygulamasında gözlenen hücre deformasyonu ve nekroz ise anatomik hasarı göstermektedir.

Bu çalışmada, Cr ağır metalinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde fizyolojik, anatomik ve sitogenetik etkileri $K_2Cr_2O_7$ çözeltisi uygulaması ile incelenmiştir. Sonuç olarak, daha çok endüstriyel kullanım sonucu ve besin zinciri yoluyla tüm canlılara kontamine olan Cr ağır metalinin ciddi toksik etkilere sebep olduğu *A. cepa* test materyali kullanılarak belirlenmiştir. *A. cepa* testinin diğerkökaryotik testlerle uyumlu olduğu düşünöldüğünde bu toksik etkilerin tüm ökaryotik canlılarda oluşabileceğı muhtemeldir. Bu nedenle söz konusu maddelerin bilinçli kullanımı, kontaminasyonu en aza indirmek için gerekli tedbirlerin alınması ve toksik etkilerin azaltılması için önlem alınması zaruridir.

KAYNAKLAR

- [1].Duffus, J.H., Worth, H.G.J. Fundamental toxicology for chemists Royal Society of Chemistry, 327 pp. Cambridge. 1996.
- [2].Baldwin, D.R., Marshall, W.J. Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*, 36, 267-300, 1999.
- [3].Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera and H. Avudainayagam S. Chromium Toxicity in Plants. *Environ. Int.*, 31, 739-753, 2005.
- [4].Cervantes, C., Garcia, J.C., Devars, S. and Corona, F.G. Interactions of Chromium with Micro-Organisms and Plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 335-347, 2001.
- [5].Kimbrough, D.E D., Cohen, Y. and Winer A.M. A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 29, 1-46,1999.
- [6].Vajpayee, P., Rai, U.N., Ali, M.B.,Tripathi, R.D., Yadav, V., Sinha, S. and Singh, S.N. Chromium-Induced Physiological Changes in *Vallisneria spiralis* L. and Its Role in Phytoremediation of Tannery Effluent. *B. Environ. Contam. Tox.*, 67, 246-256, 2001.
- [7].Zayed, A.M., Terry, N. Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation. *Plant Soil*, 249, 139-156, 2003.
- [8].Solange, B.T., Haywood, D.L. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*. 138, 2012.
- [9].Bagatini, M.D., Silva, A.C.F. and Tedesco, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 444-447, 2007.
- [10].Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 71–81, 2009.
- [11].Kafadar, F., Saygıdeğer, S. Gaziantep İlinde Organize Sanayi Bölgesi Atık Suları İle Sulanan Bazı Tarım Bitkilerinde Kurşun (Pb) Miktarlarının Belirlenmesi. *Ekoloji*, 19(75), 41-48, Gaziantep, 2010.
- [12].Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö. ve Çobanoğlu, D. Ağır Metal İyonlarının (Cu+2, Pb+2, Hg+2, Cd+2) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin

Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *F.Ü. Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 16(2), 177-182, 2004.

- [13]. Volesky, B. Biosorption by fungal biomass. In Biosorption of Heavy Metals; Volesky, B., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 139-172, 1990.
- [14]. Han, F. X., Maruthi, Sridhar, B. B., Monts, D. L., and Su, Y. Phytoavailability and Toxicity of Trivalent and Hexavalent Chromium to *Brassica juncea*. *New Phytol.*, 162, 489-499, 2004.
- [15]. Strlic, M., Kolar, J., Selih, VS., Kocar, D. and Pihlar, B. A Comparative Study of Several Transition Metals in Fenton Like Reaction System at Circum-Neutral pH. *Acta Chim. Slov.*, 50, 619-632, 2003.
- [16]. Ting, Y.P., Lawson, F. The influence of cadmium and zinc on the cell size distribution of the alga *Chrorella vulgaris*. *The chemical Engineering Journal*, 3, 23-34, 1991.
- [17]. Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. Chromium Ions Inactivate Electron Transport and Enhance Superoxide Generation in vivo in Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) Root Mitochondria. *Plant Cell Environ.*, 25, 687-690, 2002.
- [18]. Ramachandran, V., D'souza, T. J., and Mistry, K. B. Uptake and Transport of Chromium in Plants. *J.Nucl.Agric.Biol.*, 9, 126-128, 1980.
- [19]. Lindberg, S., Taylor, G. E., Turner R.R. and Schroeder W.H. Atmosphere-Surface Exchange of Mercury in A Forest: Results of Modeling and Gradient Approaches. *J. Geophys. Res.*, 97, 2519-2528, 1992.
- [20]. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants, London, Academic Press, 2002.
- [21]. Wallace, A., Soufi, S.M., Cha, J.W. and Romney, EM. Some Effects of Chromium Toxicity on Bush Bean Plants Grown in Soil. *Plant Soil*, 44, 471-473, 1976.
- [22]. Yıldız, M., Terzi, H. ve Urşak, B. Bitkilerde krom toksisitesi ve hücre sel cevaplar. *Erciyes Ün. Fen Bilimleri Enst. Dergisi*, 27(2), 163-176, 2011.
- [23]. Zayed, A.M., Lytle, C.M., Qian, J.H. and Terry, N. Chromium Accumulation Translocation and Chemical Speciation in Vegetable Crops. *Planta*, 206, 293-299, 1998.

- [24]. Howe, J.A., Loeppert, R.H., Deroose, V.J., Hunter, D.B. and Bertsch, P.M. Localization and Speciation of Chromium in Subterranean Clover Using XRF, XANES, and EPR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 4091-4097, 2003.
- [25]. Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Lecoigt, G. and Hitmi, A. Effect of Chromium Species on Phytochemical and Physiological Parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere*, 72, 763-771, 2008.
- [26]. Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Rosa, G. and Corral-Diaz, B. Bioaccumulation of Cadmium, Chromium and Copper by *Convolvulus arvensis* L., Impact on Plant Growth and Uptake of Nutritional Elements. *Bioresource Technol.*, 92, 229- 235, 2004.
- [27]. Golovatyj, S.E., Bogatyreva, E.N. and Golovaty, S.E. Effect of Levels of Chromium Content in a Soil on Its Distribution in Organs of Corn Plants. *Soil Res. Fertil.*, 99, 197-204, 1999.
- [28]. Huffman, E.W.D., Alloway, H.W. Chromium in Plants: Distribution in Tissues, Organelles, and Extracts and Availability of Bean Leaf Cr to Animals. *J. Agric. Food Chem.*, 21, 982-986, 1973.
- [29]. Choudhury, S., Panda, S.K. Toxic Effect, Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss *Taxitheelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under Lead and Chromium Toxicity. *Water Air Soil Poll.*, 167, 73- 90, 2005.
- [30]. Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. Chromium Effect on ROS Generation and Detoxification in Pea (*Pisum sativum*) Leaf Chloroplasts. *Protoplasma*, 236, 85-95.
- [31]. Ali, S., Bai, P., Zeng, F.R., Cai, S.G., Shamsi, I.H., Qiu, B.Y., Wu, F.B. and Zhang, G.P. The Ecotoxicological and Interactive Effects of Chromium and Aluminum on Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Enzymes on Two Barley Genotypes Differing in Al Tolerance. *Environ. Exp. Bot.*, 70, 185-191, 2011.
- [32]. McGrath, S.P. Chromium and Nickel, pp.152-178, In: Alloway, B.J., (Ed) Heavy Metal In Soils, Second Ed. Chapman and Hall, Great Britain, 1995.

- [33]. Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V. and Speranza, A. Uptake and Toxicity of Cr(III) in Celery Seedlings. *Chemosphere*, 64, 1695-1703, 2006.
- [34]. Castro, R.O., Martínez-Trujillo, M., López Bucio, J. and Cervantes, C.E. Effects of Dichromate on Growth and Root System Architecture of *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Sci.*, 172, 684-691, 2007.
- [35]. Karuppanapandian, T., Manoharan, K. Uptake and Translocation of Tri- and Hexa-Valent Chromium and Their Effects on Black Gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) Roots, *J. Plant Biol.*, 51, 192-201, 2008.
- [36]. Hall, J.L. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53, 1-11, 2002.
- [37]. Cobbett, C., Goldsbrough, P.B. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 159-182, 2002.
- [38]. Mittler, R. Oxidative Stress, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410, 2002.
- [39]. Şekeroğlu V., Şekeroğlu A. Z. Micronucleus test for determining genotoxic damage. *Tur Hij Den Biyol Der.* 68 (4), 241-252, 2011.
- [40]. Levitt, J. Response of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, 1980.
- [41]. Barlett, J.R., James, B.R. Mobility and Bioavailability of Chromium in Soils, pp.267-304, In: Nriagu, J.O., Nieboer, E., (Eds), Chromium in Natural and Human Environment, John Wiley And Sons Inc., New York, 1988.
- [42]. Awe, E. T., Akpan, U. U. Cytological study of *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Acta SATECH*, 9 (1), 113-120, 2017.
- [43]. Mukherjee, A., Roy, S. C. Karyotype Analysis Of Five Species Of *Allium* Ind. *J. Fundam. Appl. Life Sci.*, 2 (2), 374-383, 2012.
- [44]. Vujosevic, M., Jovanovic, V. and Blagojevic, J. Polyploidy and B Chromosomes in *Allium flavum* from Serbia. *Arch. Biol. Sci.*, 65, 23-32, 2013.
- [45]. <http://azkurs.org/sogan-allium-cepa-l-familya-amaryllidaceae.html>
- [46]. Levan, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*, *Hereditas*, 24, 471- 486, 1938.

- [47]. Fiskesjö, G. The Allium-test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112, 1985.
- [48]. Fiskesjö, G. The Allium test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243–260, 1988.
- [49]. Fiskesjö, G. The Allium test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual*, 8, 291-298, 1993.
- [50]. Fiskesjö, G. The Allium Test II: Assessment of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environ Toxicol Water Qual*, 9, 234-241, 1994.
- [51]. Fiskesjö, G. Allium test: In vitro toxicity testing protocols. *Meth. Mol. Biol.*, 43, 119-127.
- [52]. Rank, J., Nielsen, M.H. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater, *Mutation Research*, 312, 1, 17- 24, 1994.
- [53]. Vicentini, V.E.P., Camparoto, M.L., Teixeira, R.O. and Mantovani, M.S. Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*, 23, 593-598, 2001.
- [54]. Camparoto, M. L., Teixeira, R.O., Mantovani, M. S. and Vicentini, V.E.P. Effects of Maytenus ilicifolia Mart. and Bauhinia candicans Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 85-89, 2002.
- [55]. Darbelley, N., Driss-Ecole, D. and Perbal, G. Elongation and mitotic activity of cortical cells in lentil roots grown in microgravity. *Plant Physiological Biochemistry*, 27, 341-347, 1989.
- [56]. Driss-Ecole, D., Schoevaert, D., Noin, M. and Perbal, G. Densitometric analysis of nuclear DNA content in lentil roots grown in space. *The Cell*, 81, 59-64, 1994.
- [57]. Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research*, 244, 95-103, 1990.

- [58]. Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392, 19–30, 1997.
- [59]. Von Ledeber, M.M., Schmid, W. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutation Research*, 19, 109-17, 1973.
- [60]. Högstedt, B., Karlsson, A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, 156, 229-32, 1985.
- [61]. Wei, Q.X. Mutagenic effects of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. *Journal of Zhejiang University Science*, 5, 1570–1576, 2004.
- [62]. Atik, M., Karagüzel, O. ve Ersoy, S. Sıcaklığın *Dalbergia sissoo* tohumlarının çimlenme özelliklerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 203–210, 2007.
- [63]. Staykova, T.A., Ivanova, E.N. and Velcheva, I.G. Cytogenetic effect of heavy metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 41–46, 2005.
- [64]. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534, 65, 2003.
- [65]. Makbul, S., Kandemir, A., Turkmen, Z. and Beyazoglu, O. Morphological and anatomical features of *Verbascum alyssifolium*. *Herbal Journal System Botanic*, 15, 125-140, 2008.
- [66]. Panda, S.K., Mahapatra, S. and Patra, I.I.K. Chromium Toxicity and Water Stress Simulation Effects in Intact Senescing Leaves of Green Gram (*Vigna radiata* L. Var Wilckzeck K851), pp.129-136, 2002.
- [67]. Peralta, J.R., GardeaTorresday, J.L. Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *B. Environ. Contam. Tox.*, 66, 727-734, 2001.
- [68]. Gupta, S., Srivastava, S. and Saradhi, P.P. Chromium Increases Photosystem 2 Activity in *Brassica juncea*. *Biol. Plant.*, 53, 100-104, 2009.

- [69]. Zurayk, R., Sukkariah, B. and Baalbaki, R. Common Hydrophytes as Bioindicators of Nickel, Chromium and Cadmium Pollution, *Water Air Soil Poll.*, 127, 373-388, 2001.
- [70]. Subrahmanyam, D. Effects of Chromium Toxicity on Leaf Photosynthetic Characteristics and Oxidative Changes in Wheat (*Triticumaestivum* L.). *Photosynthetica*, 46, 339-345, 2008.
- [71]. Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. Differential Chromium Tolerance Among Eight Mung Bean Cultivars Grown in Nutrient Culture. *J. Plant Nutr.*, 20, 341-347, 1997.
- [72]. Gupta, K., Gaumat, S. and Mishra, K. Studies on phyto-genotoxic assessment of tannery effluent and chromium on *Allium cepa*. *J. Environ. Biol.* 33, 557-563, 2012.
- [73]. Fang, Z., Zhao, M., Zhen, H., Chen, L., Shi, P. and Huan, Z. Genotoxicity of Tri- and Hexavalent Chromium Compounds *In Vivo* and Their Modes of Action on DNA Damage *In Vitro*. *PLOS ONE*, 9, 8, 2014.
- [74]. Arakawa, H., Wu, F., Costa, M., Rom, W. and Tang, M. Sequence specificity of Cr (III)–DNA adduct formation in the p53 gene: NGG sequences are preferential adduct-forming sites. *Carcinogenesis*, 27, 639–645, 2006.
- [75]. O'Brien, T.J., Brooks, B.R. and Patierno, S.R. Nucleotide excision repair functions in the removal of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem.*, 279, 85–95, 2005.
- [76]. Xu, J., Manning, F.C., Patierno, S.R. Preferential formation and repair of chromium-induced DNA adducts and DNA-protein crosslinks in nuclear matrix DNA. *Carcinogenesis*, 15, 1443–1450, 1994.
- [77]. Zhitkovich, A., Shrager, S. and Messer, J. Reductive metabolism of Cr(VI) by cysteine leads to the formation of binary and ternary Cr–DNA adducts in the absence of oxidative DNA damage. *Chem Res Toxicol.*, 13, 1114–1124, 2000.
- [78]. Vijayalakshmi, R., Subramanian, V., Nair, B.U. and Sarma, R.H. A study of the interaction of Cr (III) complexes and their selective binding with B-DNA: A molecular modeling approach. *J Biomol Struct Dyn.*, 19, 1063–1071, 2002.

- [79]. Fenech, M., Crott, W.J. 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. *Mutation Research*, 504, 131-136, 2002.
- [80]. Fenech, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry'', *Health Phys*, 98(2), 234-243, 2010.
- [81]. Thomas, P., Holland, N., BolognesiI, C., Kirsch-Volders, M., BonassiI, S., Zeiger, E K. and Fenech, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, 4(6), 825-837, 2009 .
- [82]. Wu, J., Lyons, GH., Graham, RD. and Fenech, M. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research*, 24(3), 225-232, 2009.
- [83]. Fenech, M. The in micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95, 2000.
- [84]. Paschke, M.W. Valdecantos, A. and Redente, E.F. Manganese toxicity thresholds for restoration grass species. *Environmental Pollution*, 135, 313-322, 2005.
- [85]. Baker, A.J.M. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, 3, 643-654, 1981.

ÖZGEÇMİŞ

Nurşah OCAK GÜREL 1991 yılında Giresun’da doğdu. İlköğretimi Atatürk İlköğretim Okulunda, Orta Öğretimi Mehmet Akif Ersoy Okulunda ve Lise Eğitimini Giresun Lisesinde tamamladı. 2009 yılında Giresun Lisesinden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2013 yılında bitirdi. 2016 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini 2018 yılında tamamladı.

