

In Vivo Pb(NO₃)₂ Toksisitenin Fizyolojik, Sitogenetik ve Anatomik Parametreler ile Araştırılması

Nurcan GİRASUN¹, Emine YALÇIN², Ali ACAR³, Kürşat ÇAVUŞOĞLU⁴, Kültiğin ÇAVUŞOĞLU⁵

¹Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, ²Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun, ³Giresun Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Giresun, ⁴Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta, ⁵Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-5540-151X>, ²<https://orcid.org/0000-0002-5280-5375>, ³<https://orcid.org/0000-0001-8617-2206>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-6457-0457>, ⁵<https://orcid.org/0000-0002-4767-9132>

✉: emine.yalcin@giresun.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, Pb(NO₃)₂'nin *Allium cepa* L.'da sebep olduğu fizyolojik, anatomik ve sitogenetik etkiler araştırılmıştır. Kök uzunluğu, çimlenme yüzdesi ve ağırlık artışı fizyolojik parametreler; kromozomal hasar oluşumu, mitotik indeks (MI) ve mikronukleus (MN) sıklığı ise sitogenetik parametreler olarak kullanılmış, kök ucu kesitlerinde ise anatomik hasarlar araştırılmıştır. Toksisitenin belirlenmesi amacıyla bir kontrol ve üç uygulama grubu oluşturulmuş ve uygulama grupları 50, 100 ve 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ çözeltisi ile 25 °C'de 72 saat muamele edilmiştir. Deneysel işlemler sonucunda, Pb(NO₃)₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, ağırlık kazanımını ve MI oranını azalttığı, MN sıklığı ve kromozomal hasar oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Pb(NO₃)₂'nin fragment, yapışkan kromozom, kromozom köprüsü ve c-mitoz şeklinde kromozomal hasarları teşvik ettiği gözlenmiştir. Ayrıca, Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök ucunda korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu, belirgin olmayan iletim doku, nekroz gibi anatomik hasarlara neden olduğu da tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Pb(NO₃)₂'nin doza bağlı olarak toksisiteye neden olduğu ve bu hasarların belirlenmesinde *A. cepa*'nın güçlü bir biyoindikatör olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 08.03.2019

Kabul Tarihi : 09.05.2019

Anahtar Kelimeler

Anatomi
Fizyoloji
Pb(NO₃)₂
Kromozomal hasar
Mikronukleus
Mitotik indeks

Investigation of In-vivo Pb(NO₃)₂ Toxicity with Physiological, Biochemical and Cytogenetic Parameters

ABSTRACT

In this study, physiological, anatomical and cytogenetic effects of Pb(NO₃)₂ in *Allium cepa* L. were investigated. The root length, percentage of germination and weight increase were used as physiological parameters and chromosomal damage frequency, mitotic index (MI) and micronucleus (MN) frequency were determined as cytogenetic parameters and anatomical damages were investigated in root tip cross sections. To determine the toxicity, a control and three treatment groups were formed and the treatment groups were germinated with 50, 100 and 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ at 25°C for 72 hours. The results indicated that Pb(NO₃)₂ application decreased the germination percentage, root length, weight gain and MI, and increased the MN frequency and chromosomal damage formations. It was observed that Pb(NO₃)₂ induced chromosomal damages such as fragment, sticky chromosome, chromosome bridge and c-mitosis. In addition, Pb(NO₃)₂ application caused the anatomic damages including cortex cell wall thickening, cell deformation, nonspecific transmission tissue, necrosis in *A. cepa* root cells. As a result, Pb(NO₃)₂ was found to cause toxicity depending the application dose and it was determined that *A. cepa* was a strong bioindicator in determining the toxicity.

Research Article

Article History

Received : 08.03.2019

Accepted : 09.05.2019

Keywords

Anatomy
Physiology
Pb(NO₃)₂
Chromosomal Aberrations
Micronucleus
Mitotic Index.

GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ve bu artışla birlikte gelişen endüstrileşme beraberinde pek çok sorunu da ortaya çıkarmıştır. Çevre kirliliği ve bu kirliliğe maruz kalan canlılarında gözlenen sağlık problemleri de ortaya çıkan en önemli sorunlardandır. Günümüzde endüstride çok farklı kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Çevreye zarar veren ve canlı organizmalar üzerine toksik etki gösteren ağır metaller ise endüstriyel alanlarda oldukça fazla kullanılan kimyasallardır. Ağır metaller, atom numarası 20'den fazla olan ve özgül ağırlıkları 5 gr/cm³'den büyük olan elementlerdir (Baldwin ve Marshall, 1999; Kafadar ve Saydıdeğer, 2010). Ağır metaller doğal yollarla yâda çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu kirlilik oluşturmaktadırlar. Ağır metaller, biyolojik tepkimelere katılma durumlarına göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan ağır metaller şeklinde sınıflandırılmaktadır. Yaşamsal olan ağır metallerin, canlı organizmalarda belirli bir seviyede mutlaka bulunmaları gerekmektedir. Bu metaller canlılarda pek çok biyolojik reaksiyonlarda rol almaktadırlar ve bu nedenle de besin yoluyla düzenli olarak alınmaları gerekmektedir. Yaşamsal olmayan ağır metaller ise canlı organizmalarda çok düşük dozlarda bile ciddi hastalıklara neden olmaktadır (Baldwin ve Marshall, 1999). Kurşun (Pb), krom, kadmiyum, demir, bakır, kobalt, nikel, çinko ve civa gibi metaller, ağır metaller sınıfına girmektedirler. Bu ağır metallerden, akümülyasyon özelliğinden dolayı yüksek toksisite gösteren Pb, çevredeki sanayi kuruluşlarının faaliyetleri sonucu atık ürün olarak oluşabildiği gibi, günlük yaşamımızda kullandığımız pek çok ürün nedeniyle de çevreye yayılabilmektedir (Duffus, 1980; Kahvecioğlu ve ark., 2009). Akümülyatör, pil ve elektronik eşyaların üretimi, silah ve savunma teknolojileri, nükleer santrallerde radyasyon ve ısı radyasyon yalıtımı işlemleri Pb kontaminasyonuna neden olan başlıca işlemlerdendir. Pb benzin katkı maddelerinin, otomobil parçalarının, pestisitlerin üretiminde de oldukça fazla kullanılmaktadır. Geniş kullanım sahası, Pb'yi çevreyi en fazla kirleten ve canlılar üzerinde en fazla toksik etki gösteren başlıca metal haline getirmektedir (Guevara ve ark., 2004). Genel olarak çevreye salınan Pb; Pb(NO₃)₂, Pb₄O(PO₄)₂, Pb₃(PO₄)₂, Pb₅(PO₄)₃OH ve PbCO₃ bileşikler oluşturmakta ve söz konusu bileşikler aracılığıyla besin zincirine girmektedir (Girasun, 2017). Bu çalışmada, Pb(NO₃)₂ bileşiğinin toksik etkileri, fizyolojik, sitogenetik ve anatomik açıdan *Allium cepa* test materyali kullanılarak araştırılmıştır. Yüksek yapılı bitkiler pek çok kimyasalın toksisitesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Birleşmiş Milletler Çevre Programı ve ABD Çevre Koruma Ajansı'nın (USEPA) bitkilerin toksisitenin belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanımını standartlaştırmıştır (Ma ve ark., 1995; Ma

ve ark., 2005). USEPA ve Dünya Sağlık Örgütü, bu testlerden elde edilen verilerin toksisitenin belirlenmesinde etkili ve güvenilir olduğunu kabul etmektedir. *Allium* testi toksisitenin belirlenmesinde uygulanan yaygın bir yöntemdir. *A. cepa*, monosentrik kromozomlu diploid (2n=16) bir genoma sahiptir ve kromozomlarının oldukça büyük olması karyomorfolojik değişikliklerin saptanmasında kolaylık sağlamaktadır. *A. cepa*, toksik ajanların sitotoksik, fizyolojik, klastojenik ve aneugenik etkilerinin saptanmasında oldukça kullanışlıdır (Solange ve Haywood, 2012). Bu veriler ışığında, Pb(NO₃)₂'in in vivo toksik etkileri *Allium* testi ile fizyolojik, sitogenetik ve anatomik açıdan değerlendirilmiştir. Fizyolojik etkiler çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı parametreleri ile sitogenetik etkiler ise; MI, MN sıklığı ve kromozomal anormallik parametreleri ile incelenmiştir. Pb(NO₃)₂'in anatomik etkileri ise kök ucu enine kesitlerinin mikroskopik incelemesi ile belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Kök Uçlarının Hazırlanması

Bu çalışmada, Giresun ilinde faaliyet gösteren marketlerden alınan *A. cepa* soğanları kullanılmıştır. Soğanlar kontrol ve üç uygulama olmak üzere toplam dört gruba ayrılmış, 25 °C'de 72 saat çimlendirilmiştir. Kontrol grubundaki soğanlar çeşme suyu, uygulama grubundaki soğanlar ise sırasıyla 50, 100 ve 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ ile muamele edilmiştir. Çimlenen soğanların kurumasını önlemek amacıyla, günlük olarak kontrol edilmiş ve gerekli ilaveler yapılmıştır. Uygulama periyodunun sonunda, kök uçları distile su ile yıkanmış ve standart preparasyon yöntemleriyle, sitogenetik analizler için hazır duruma getirilmiştir (Ocak ve ark., 2018).

Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi

Çimlenme yüzdesi; çimlenen soğan sayısının, toplam soğan sayısına oranı alınarak %Çimlenme olarak ifade edilmiştir. Kök uzunlukları milimetrik cetvel kullanılarak radikula oluşumu baz alınarak belirlenmiştir. Ağırlık kazanımları ise Pb(NO₃)₂ uygulama öncesinde ve sonrasında belirlenen ağırlıklar arasındaki fark dikkate alınarak hesaplanmıştır (Çavuşoğlu ve ark., 2018).

Sitogenetik Testler

Kromozomal hasarların tespiti için yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilen kök uçları, 2 saat "Clarke" fiksatoründe (3:Etanol/1:Glasiyal Asetik Asit) fiksasyona tabi tutulmuş, ardından 15 dk. %96'lık etanolde yıkanmıştır. Sonrasında, kök uçları 60 °C'de 17 dk. 1N HCl içerisinde hidrolize edilmiş ve Aseto-Karmin ile boyanmıştır. %45'lik asetik asitte ezilerek

hazırlanan kök ucu preparatları kromozomal anormallik, MN sıklığı ve MI oranları için araştırma mikroskopunda incelenmiştir (Staykova ve ark., 2005) MN varlığının belirlenmesi amacıyla her bir uygulama grubundan toplamda 1000 hücre sayılmıştır. MN tespitinde Fenech ve ark. (2003)'nin kriterleri göz önünde bulundurulmuştur. MI'nin belirlenmesinde, preparatlardan her bir grup için 10.000 hücre sayılmış ve MI yüzdesi yüzdesi aşağıdaki Eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Mitotik İndeks (MI \%)} = \frac{\text{Mitoza Girmiş Hücre}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

Anatomik Gözlemler

Anatomik hasarın tespitinde, her bir gruba ait kök uçları, distile su ile yıkanarak kimyasal kalıntılardan arındırılmıştır. Kök ucundan alınan enine kesitler metilen mavisi ile boyanmış ve araştırma mikroskopunda X500 büyütmede incelenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Analizler "IBM SPSS Statistics 22" paket programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama \pm SD (standart sapma) şeklinde gösterilmiş, ortalamalar arasındaki istatistiksel önem One-way ANOVA ve Duncan testi ile belirlenmiş, p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada, Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde fizyolojik, sitogenetik ve anatomik parametreler üzerine etkileri incelenmiştir. Pb(NO₃)₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, ağırlık artışı ve kök uzunluğu üzerine etkileri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Pb(NO₃)₂'nin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde çimlenme, ağırlık ve kök uzunluğu üzerine etkisi

Gruplar	Çimlenme (%)	Ağırlık değişimi (gr)	Kök uzunluğu (cm)
Grup I	100	+5.26 \pm 1.22(%100) ^a	10.89 \pm 2.03 ^a
Grup II	85	+4.52 \pm 1.19 (%87) ^a	8.00 \pm 1.79 ^b
Grup III	70	+3.47 \pm 0.97 (%67) ^b	5.10 \pm 0.74 ^c
Grup IV	45	+2.42 \pm 0.91 (%47) ^c	2.90 \pm 0.99 ^d

*Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir (n=10). Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler^(a-d) istatistiksel açıdan öneme işaret etmektedir (p<0.05).

Sonuçlardan da görüldüğü gibi, en fazla çimlenme yüzdesi kontrol grubunda en az ise 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ uygulanan Grup IV'de gözlenmiştir. Grup IV'nin çimlenme yüzdesi kontrol grubuna göre yaklaşık %55 oranında azalmıştır. Benzer bir toksik etki ağırlık kazanımında da gözlenmiş, 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ uygulamasının ağırlık artışını kontrol grubuna kıyasla %54 azalttığı belirlenmiştir. Ağırlık artışlarında gözlenen bu azalmaların kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı olduğu

belirlenmiştir (p<0.05). Pb(NO₃)₂ toksisitesinin kök uzamasını da önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiş, kontrol grubuna oranla Grup II'de kök uzunluğunun %26.5, Grup III'de %53.1, Grup IV'de ise %73.3 oranında azaldığı belirlenmiştir. Uygulanan Pb(NO₃)₂ dozunun artması ile kök uzunluğunun azaldığı, bu azalmanın da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu (p<0.05) tespit edilmiştir.

A. cepa kök ucu hücrelerinde Pb(NO₃)₂'nin MN oluşumu ve sıklığı ile MI değeri üzerine etkileri Çizelge 2 ve Şekil 1'de verilmiştir. Kontrol grubu kök ucu hücrelerinde oldukça düşük oranda MN oluşumu gözlenirken, en fazla MN oluşumu 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ uygulanan Grup IV'de gözlenmiştir.

Kontrol grubu kök ucu hücrelerinde yaklaşık olarak 0.22 \pm 0.44 oranında MN oluşumu tespit edilirken, Grup II'de ortalama 7.91 \pm 3.56 oranında, Grup III'de ortalama 29.40 \pm 4.14 oranında ve Grup IV'de ise ortalama 56.50 \pm 4.38 oranında MN oluşumuna rastlanılmıştır. Gruplar arasında gözlenen MN sayılarındaki farkların ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu da tespit edilmiştir (p<0.05).

Pb(NO₃)₂ uygulaması sonucu, hücre proliferasyonuna yani çoğalma ve bölünme hızına işaret eden MI sayılarındaki değişim değerlendirildiğinde ise en yüksek MI oranı kontrol grubu kök ucu hücrelerinde tespit edilirken, Pb(NO₃)₂'nin uygulanan her üç grupta da MI oranının ciddi oranda azaldığı belirlenmiştir (p<0.05).

Çizelge 2. Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde MN ve MI sıklığı üzerine etkisi

Gruplar	MN sıklığı	Mitotik Hücre	MI (%)
Grup I	0.22 \pm 0.44 ^d	941.89 \pm 25.14 ^a	9.42
Grup II	7.91 \pm 3.56 ^c	819.55 \pm 61.65 ^b	8.20
Grup III	29.40 \pm 4.14 ^b	643.60 \pm 48.08 ^c	6.44
Grup IV	56.50 \pm 4.38 ^a	482.60 \pm 32.97 ^d	4.83

*Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir (n=10). Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler^(a-d) istatistiksel açıdan öneme işaret etmektedir.

Kontrol grubunda %9.42, uygulama gruplarında ise sırasıyla %8.20, %6.44 ve %4.83 oranında MI tespit edilmiştir. 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂'nin uygulanan Grup IV'de MI oranının kontrol grubuna oranla 1.95 kat azaldığı belirlenmiştir. Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde teşvik ettiği kromozomal hasarlar Çizelge 3 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

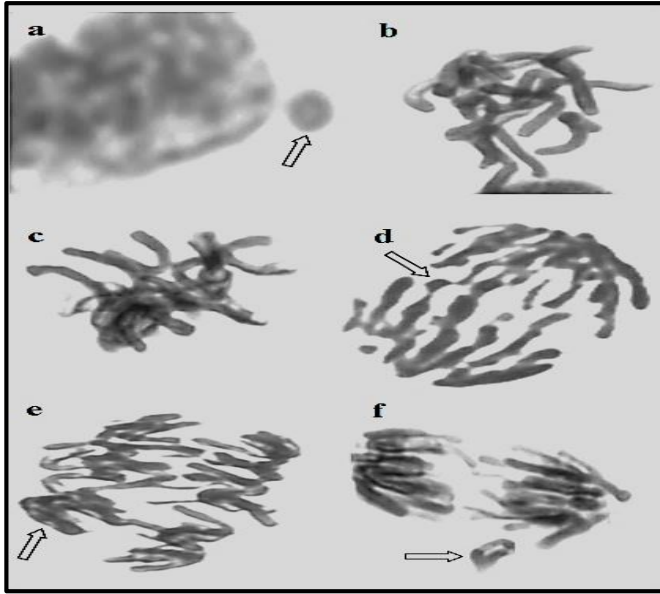
Mikroskopik incelemeler neticesinde Pb(NO₃)₂'nin teşvik ettiği kromozomal hasarlar; kromatinin eşit olmayan dağılımı, fragment, yapışkan kromozom, kromozom köprüsü ve c-mitoz olarak belirlenmiştir.

Pb(NO₃)₂ uygulamasının en büyük etkinin fragment oluşumu, en az ise c-mitoz şeklinde olduğu gözlenmiştir. 200 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ uygulanan Grup IV'de gözlenen fragment düzeyinin, c-mitoza kıyasla yaklaşık 2.15 kat fazla olduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 3. Pb(NO₃)₂ uygulaması sonucu teşvik edilen kromozomal hasarlar

Gruplar	FRG	YK	KK	KED	CM
Grup I	0.00±0.00 ^d	0.33±0.50 ^d	0.00±0.00 ^d	0.22±0.44 ^d	0.11±0.33 ^d
Grup II	8.73±3.23 ^c	8.36±3.17 ^c	6.64±3.17 ^c	4.55±2.30 ^c	3.73±1.79 ^c
Grup III	25.50±3.21 ^b	23.20±3.85 ^b	17.40±2.22 ^b	15.20±3.58 ^b	13.90±2.77 ^b
Grup IV	44.80±5.85 ^a	39.30±3.06 ^a	30.60±3.95 ^a	26.20±3.74 ^a	20.80±3.08 ^a

* Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir (n=10). Kromozomal hasarlar her bir gruptaki, her bir kök ucundan 100 hücre, toplamda ise 1.000 hücre analiz edilerek hesaplandı. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler^(a-d) istatistiksel açıdan öneme işaret etmektedir ($p<0.05$). YK: yapışkan kromozom, FRG: fragment, KK: kromozom köprüsü, CM: c-mitoz, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı



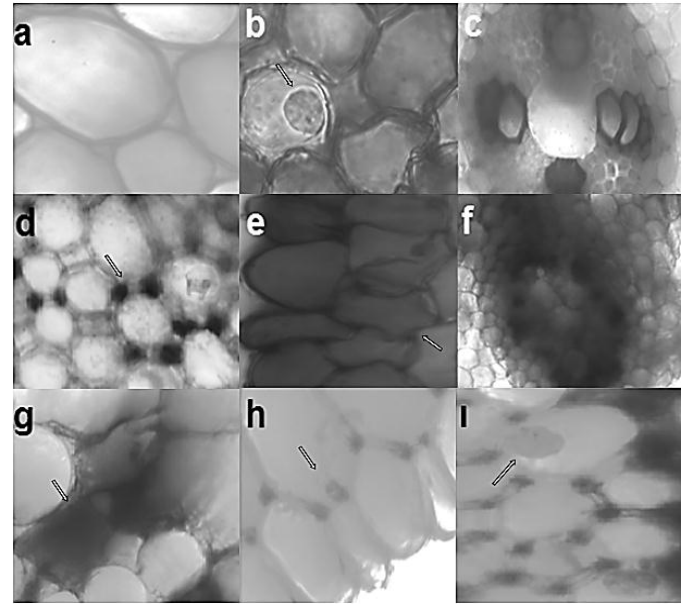
Şekil 1. Pb(NO₃)₂ tarafından oluşturulan kromozomal hasarlar. a: MN, b: c-mitoz, c: yapışkan kromozom, d: kromozom köprüsü, e: kromatinin eşit olmayan dağılımı, f: fragment

Kontrol grubu kök ucu hücrelerinde birkaç yapışkan kromozom, kromatinin eşit olmayan dağılımı ve c-mitoz dışında herhangi bir hasar görülmezken, Pb(NO₃)₂ uygulanan her üç grupta da farklı oranlarda pek çok kromozomal hasar tespit edilmiştir. Bununla birlikte Pb(NO₃)₂ uygulama dozunun artışına bağlı olarak kromozom hasar sayılarının arttığı, bu artışında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

A. cepa kök ucu meristematik hücrelerinde Pb(NO₃)₂ tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar Şekil 2'de gösterilmiştir. Pb(NO₃)₂ uygulaması kök ucu hücrelerinde; korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma, hücre deformasyonu, belirgin olmayan iletim doku, nekroz, korteks hücrelerinde madde birikimi ve yassılaştırmış hücre çekirdeği şeklinde anatomik hasarların oluşmasına neden olmuştur. Söz konusu hasarların uygulanan Pb(NO₃)₂ dozuna bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çevre kirliliği günümüzün en büyük sorunlarından ve kirlilik etmenlerinin toksik etkilerinin araştırıldığı bilimsel çalışmalar önem arz etmektedir.



Şekil 2. Pb(NO₃)₂ uygulaması tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar: a: korteks hücrelerinin olağan görünümü, b: hücre çekirdeğinin olağan görünümü, c: iletim dokunun olağan görünümü, d: korteks hücre çeperinde kalınlaşma, e: hücre deformasyonu, f: belirgin olmayan iletim doku, g: nekroz, h: korteks hücrelerinde madde birikimi, i: yassılaştırmış hücre çekirdeği

Çevre kirlenmelerinin toprak, su ve havada gün geçtikçe artması doğal ve sürdürülebilir çevrenin yok olmasına yol açmakta ve canlı yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmada, yaygın çevre kirlenmelerinden biri olan Pb(NO₃)₂'nin *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki toksik etkileri fizyolojik, anatomik ve sitogenetik parametreler kullanılarak araştırılmıştır.

Fizyolojik parametreler olarak çimlenme yüzdesi, ağırlık artışı ve kök uzunluğu incelenmiş, artan Pb(NO₃)₂ dozuna bağlı olarak çimlenme yüzdesi, ağırlık artışı ve kök uzunluğunun azaldığı, bu azalmanın da kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada Pb(NO₃)₂ uygulanan gruplarda fizyolojik parametrelerde gözlenen anormallikler Pb'nin toksik etkileri ile açıklanabilir. Ağır metaller düşük dozlarda bitki gelişimi için önemli mikro-element olmakla beraber yüksek dozlardaki elementlerin bitkilerin büyümesini inhibe ettiği ve toksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Fernandes ve Henriques, 1991). Pek çok çalışmada, yüksek dozda Pb maruziyetinin

bitkilerde mineral alımı, fotosentetik aktivite, klorofil sentezi ve membran permeabilitesi gibi pek çok metabolik reaksiyonları olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005; Ghani ve ark., 2010). Bu önemli hücreyel yollarda meydana gelen inhibisyon bitkide büyümeyi yavaşlatacak, kök büyümesini, ağırlık artışını azaltacak ve doğal olarak çimlenmeyi de geciktirecektir. Literatürde, Pb gibi ağır metallerin bitkilerde fizyolojik parametrelerde meydana getirdiği değişimi araştıran bazı çalışmalar mevcuttur. Kiran ve ark. (2015) *Lactuca sativa* var. *crispa*'da Pb uygulamasının, bitki yaş ağırlığında kontrol grubuna oranla azalmaya yol açtığını tespit etmişlerdir. Burton ve ark. (1984) Pb toksisitesinin bitkilerde spesifik belirtilerinin; kök büyüme ve gelişmesinin kısıtlanması, cüceleşme gibi etkileri olduğunu rapor etmişlerdir. Obroucheva ve ark. (1998) araştırmada, mısır fidelerinde Pb toksisitesinin kök gelişimini engellediğini gözlemlemişlerdir. *Cicer arietinum* L.'ye Pb ve Hg uygulanan bir çalışmada ise uygulama dozuna bağlı olarak kök büyümesinin engellendiği rapor edilmiştir (Çavuşoğlu ve ark., 2009).

Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde kromatinin eşit olmayan dağılımı, yapışkan kromozom, fragment, c-mitoz, kromozom köprüsü gibi kromozom anormalliklerine sebep olduğu ve bu hasarların doz artışına bağlı olarak da arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte sitogenetik parametre olarak incelenen MN frekansında artış, MI oranlarında ise azalma gözlenmiştir. Pb(NO₃)₂ uygulamasının sebep olduğu sitogenetik hasarlar Pb toksisitesi ile açıklanabilir. Pb, DNA zincirindeki fosfat iyonları ile kovalent bağ oluşturmakta, DNA sentezinde aksamalara neden olmakta ve tek zincir kırıklarına da sebep olmaktadır (Sirover ve Loeb, 1976; Valverde ve ark., 2002). DNA hasarına bağlı olarak mitotik anormallikler oluşmakta, bu anormallikler kromozom hasarına, MN oluşumuna ve MI oranlarında azalmaya neden olmaktadır. Literatürde ağır metallerin sitotoksitesisi ile ilgili çalışmalara bakıldığında, Doğan (2002), Pb(NO₃)₂ uygulamasının mitozu önemli derecede baskıladığını ve doz artışına bağlı olarak kromozom anormalliklerine (heterojen kromatin dağılımı, köprü, kromozom yapışması, geri kalmış kromozom) neden olduğunu rapor etmektedir. Sang ve Li (2004) ağır metal içeren sızıntı sularının *V. faba* üzerinde MN oluşumunu teşvik ederek genotoksik bir etki oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Pb(NO₃)₂ uygulamasının *A. cepa* kök hücrelerinde anatomik hasara da neden olduğu belirlenmiştir. Kök ucu anatomisi incelendiğinde uygulanan korteks hücrelerinde madde birikimi, belirgin olmayan iletim doku, yassılaştırmış hücre çekirdeği, hücre deformasyonu, korteks hücre çeperinde kalınlaşma ve nekroz gibi anormallikler gözlenmiştir. Bu

anormallikler Pb toksisitesine karşı tolerans mekanizmalarının aktive olması ve Pb akümüasyonu sonucunda anatomik hasar oluşumu ile açıklanabilir. Pb'ye karşı tolerans geliştirmek için hücre çeperinde kalınlaşma gibi değişimler oluşurken, Pb akümüasyonu sonucunda nekroz gibi hasarlar ortaya çıkmaktadır. Literatürde *A. cepa* hücrelerinde kimyasal maddelerin meydana getirdiği anatomik hasarlar üzerine çalışmalar mevcuttur. *Pinus nigra* Arnold. ve *Cedrus libani* A. Rich yapraklarının anatomisi üzerine taşıt kaynaklı Pb kirliliğinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yaprak kutikula kalınlığının arttığı; iletim demeti büyüklüğü yaprak çapı, epidermis hücre sayısı, trakeit çapı, stoma sayısı, eni ve indeksinin azaldığı rapor edilmiştir (Çavuşoğlu ve ark., 2009). Zengin ve Munzuroğlu (2003) ağır metal stresi uygulanan *Phaseolus vulgaris* L.'de kök morfoloji ve anatomisinin gövde ve yaprak dokularına kıyasla daha fazla etkilendiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuç, köklerin ortamdaki solüsyonla direkt temasta olmaları, metalin gövdeye geçişinin engellemek için köklerde birikmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada, Pb(NO₃)₂'nin *A. cepa*'da fizyolojik, anatomik ve sitogenetik hasarlara neden olduğu, söz konusu hasarların ise artan Pb(NO₃)₂ dozuna bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, çevre kirlitici ve besin zinciri yoluyla tüm canlıları tehdit eden Pb ağır metalinin, belirli konsantrasyonlarda canlılarda yüksek toksik etkilere sebep olduğu *A. cepa* test materyali kullanılarak belirlenmiştir. Pb, insan faaliyetleri sonucunda ekolojik dengede ciddi zarar oluşturan ilk metal olma özelliğine sahiptir. Pb atmosfere metal şeklinde veya bileşik oluşturarak kontamine olmakta, her iki durumda da toksik özellik taşımaktadır. Bu nedenle, söz konusu maddelerin bilinçli kullanımı, kontaminasyonu en aza indirmek için kurşunsuz benzin kullanımının teşvik edilmesi, egzoz emisyonlarının düşük değerlere çekilebilmesi, yol kenarlarına Pb'ye dayanıklı ve kirliliği gideren bitkilerin yetiştirilmesi, tarımın kontaminasyondan uzak alanlarda yapılması gibi çeşitli önlemlerle Pb kirliliğinin ve toksik etkisinin önlenmesi sağlanmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından FEN-BAP-A-140316-56 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Baldwin DR, Marshall WJ 1999. Heavy Metal Poisoning and its Laboratory Investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*, 36: 267-300.
- Burton KW, Morgan E, Roig A 1984. The Influence of Heavy Metals on The Growth of Sitka-Spruce In South Wales Forests. II Green House Experiments. *Plant and Soil*, 78: 271-282.

- Çavuşoğlu K, Acar A, Yalçın E 2018. Civa (Hg) Ağır Metal İyonunun *Allium cepa* L. (Soğan)'da Teşvik Ettiği Fizyolojik, Sitogenetik ve Anatomik Değişimlerin Araştırılması. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6: 887-892.
- Çavuşoğlu K, Kılıç S, Kılıç M 2009. Taşıtların sebep olduğu Kurşun (Pb) kirliliğinin Çam (*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana*) ve Sedir (*Cedrus libani* A. Rich.) Yapraklarının Anatomisi Üzerine Etkileri. *Biological Diversity and Conservation*, 2 (3): 92-98.
- Çavusoglu K, Yalçın E, Ergene A 2009. The Cytotoxic Effects of Zinc and Cadmium Metal Ions on Root Tip Cells of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). *Süleyman Demirel Üniversitesi Journal of Science (e-journal)*, 4 (1): 1-11.
- Doğan B 2002. Kurşun Nitratın ($Pb(NO_3)_2$)'nin Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Mitotik Kromozomları Üzerine Etkileri. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1): 27-30.
- Duffus, JH 1980. *Environmental Toxicology, Resource and Environmental Sciences Series*. New York: Halsted Press, John Wiley and Sons.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E 2003. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534 (1): 65-75.
- Fernandes JC, Henriques FS 1991. Biochemical, Physiological and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *The Botanical Review*, 57 (3): 246-273.
- Ghani A, Shah AU, Akhtar U 2010. Effect of Lead Toxicity on Growth, Chlorophyll And Lead (Pb) Content of Two Varieties Of Maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (9): 887-891.
- Girasun N 2017. *Allium cepa*'da $Pb(NO_3)_2$ 'nin Sebep Olduğu Fizyolojik, Anatomik ve Sitogenetik Değişimlerin Araştırılması. *Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 11-14 Sy.
- Guevara SR, Bubach D, Vigliano P, Lippolt G, Arribere M 2004. Heavy Metal and Other Trace Elements in Native Mussel *Diplodon chilensis* from Northern Patagonia Lakes. *Biological Trace Element Research*, 102 (1-3): 245-263.
- Kafadar F, Saygıdeğer S 2010. Gaziantep İlinde Organize Sanayi Bölgesi Atık Suları ile Sulanan Bazı Tarım Bitkilerinde Kurşun (Pb) Miktarlarının Belirlenmesi. *Ekoloji*, 19 (75): 41-48.
- Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S 2009. Metallerin Çevresel Etkileri. *Metaller Dergisi*, 136: 47-53.
- Kıran S, Özkay F, Kuşvuran Ş, Elliialtıoğlu Ş 2015. Kurşunun Kıvrık Salata (*Lactuca sativa* var. *crispa*) Bitkisinin Bazı Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (1): 83-88.
- Ma TH, Cabrera GL, Owens E 2015. Genotoxic Agents Detected by Plant Bioassays. *Rev. Environ. Health*, 20 (1): 1-14.
- Ma TH, Xu Z, Xu C, Mc Connell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H 1995. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. *Mutat. Res.*, 334: 185-195.
- Obroucheva NV, Bystrova EI, Ivanov VB, Anupova OV, Seregin IV 1998. Root Growth Responses to Lead in Young Maize Seedling. *Plant Soil*, 200: 55-61.
- Ocak N, Çavuşoğlu K, Yalçın E 2018. *Allium cepa* L.'da Krom ($K_2Cr_2O_7$)'un Toksik Etkilerinin Araştırılması. *Gaziosmanpaşa J Sci. Res.* 7 (3): 146-158.
- Sang N, Li G 2004. Genotoxicity of Municipal Landfill Leachate on Root Tips of *Vicia faba*. *Mutation Research*, 560: 159-165.
- Sharma P, Dubey RS 2005. Lead Toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (1): 35-52.
- Sirover MA, Loeb LA 1976. Metal Activation of DNA Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70: 812-817.
- Solange BT, Haywood DL 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environ. Contam.*, 138-156.
- Staykova TA, Ivanova EN, Velcheva IG 2005. 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.
- Valverde M, Fortoul TI, Diaz-Barriga F, Mejia J, del Castillo ER 2002. Genotoxicity Induced in CD-1 Mice by Inhaled Lead: Differential Organ Response. *Mutagenesis*, 17: 55-61.
- Zengin, FK, Munzuroğlu Ö 2003. Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerine Kadmiyum (Cd^{++}) ve Civa (Hg^{++})'nin Etkileri. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 24 (1): 64-75.