

AKÜ FEMÜBİD 19 (2019) 011002 (5-14)

AKU J. Sci. Eng.19 (2019) 011002 (5-14)

Doi: 10.35414/akufemubid.503565

Araştırma Makalesi / Research Article

%20 Pyridaben İçeren Primate 20 WP'nin *Allium cepa* Kök Meristematik Hücrelerine Üzerine Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri

Recep Liman¹

¹Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Uşak
ID: <https://orcid.org/0000-0002-7944-4952>

e-posta: recep.liman@usak.edu.tr.

Geliş Tarihi: 27.12.2018 ; Kabul Tarihi: 12.03.2019

Öz

%20 Pyridaben içeren Primate 20 WP (PİP) akarisit ve insektisit olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada PİP'in sitotoksik ve genotoksik etkileri *Allium cepa* kök meristematik hücrelerinde kök büyümesi, mitotik indeks (MI), kromozomal anormallik (KA)'ler ve DNA hasarı üzerindeki etkileri *Allium* ana-telofaz ve Komet testleri kullanılarak araştırılmıştır. *Allium* kök büyüme engelleme testi ile PİP'in kök uçlarının büyümesini negatif kontrol grubuna göre %50 oranında düşüren konsantrasyon (EC₅₀) değeri, 50 ppm olarak bulunmuştur. *A. cepa* kökleri PİP'in üç farklı konsantrasyonu (25, 50 ve 100 ppm), distile su (negatif kontrol) ve metil metan sülfonata (MMS, 10 ppm, pozitif kontrol) 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakılmıştır. PİP; kök büyümesini ve MI'yi istatistiksel olarak azaltarak sitotoksik etki, KA'ları (bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışıklık, köprü ve poliploidi) ve DNA hasarını istatistiksel olarak artırarak genotoksik etki göstermiştir. PİP kullanımına dikkat edilmeli ve sito-genotoksik etkileri diğer toksisite test sistemleri ile araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler

Allium; Komet;
Akarasit; İnsektisit;
DNA hasarı

Cytotoxic and Genotoxic Effects of Primate 20 WP Containing 20% Pyridaben on *Allium cepa* Root Meristematic Cells

Abstract

Primate 20 WP containing 20% pyridaben (PCP) is used as an acaricide and insecticide. In this study, cytotoxic and genotoxic effects of PCP were investigated on the root meristem cells of *Allium cepa* for its effects on root growth, mitotic index (MI), mitotic phases, chromosomal abnormalities (CAs) and DNA damage by using *Allium* ana-telophase and Comet assays. The amount of PCP concentration that reduces the growth of root tips by 50% compared to the negative control group (EC₅₀) value was determined as 50 ppm by *Allium* root growth inhibition test. *A. cepa* roots were treated with three concentrations of PCP (25, 50 and 100 ppm), distilled water (negative control) and methyl methane sulphate (MMS, 10 ppm, positive control) for 24, 48, 72 and 96 h. PCP showed a cytotoxic effect by reducing root growth and MI, but also showed genotoxic effect by increasing CAs (disturbed ana-telophase, chromosome laggards, stickiness, bridges and polyploidy) and DNA damage at significant levels. PCP should be used carefully and investigated its cyto-genotoxic effects with other toxicology test systems.

Keywords

Allium; Comet;
Acaricide; Insecticide;
DNA damage

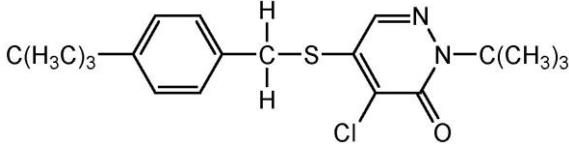
© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

%20 Pyridaben içeren Primate 20 WP (PİP), narenençiyede Pas Böcüsü (*Phyllocoptrata oleivora*) ve Turunçgil Kırmızı Örümceğine (*Panonychus citru*)

karşı, elmada Avrupa Kırmızı Örümceği (*P. ulmi*) ve İki Noktalı Kırmızı Örümceğine (*Tetranychus urticae*) karşı, domateste ise Beyaz Sinek (*Bemisia tabaci*) ve Pas akarına (*Aculops lycopersici*) karşı akarisit ve

insektisit olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Int Kyn. 1, Igarashi and Sakamota 1994, Rand and Clark 2000). Pyridaben kimyasal olarak pyridazinone grubu pestisitlerin tek üyesini oluşturmaktadır (Yu 2008). Böcek ve akarlarda mitokondriyel elektron taşıma sistemindeki Kompleks I' i inhibe ederek iş görmektedirler (Gomez *et al.* 2007, Bose and Beal 2016). Pyridabenin kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Pyridabenin kimyasal yapısı

Birleşmiş Milletler Çevre Programı, Dünya Sağlık Örgütü ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından onaylanmış olan *Allium* testi, kimyasalların toksisite ve genotoksitesini belirlenmek için kullanılan hassas, basit, tekrarlanabilirliği yüksek ve ucuz olan sitogenetik bitki sistemlerinden birisidir. Ayrıca testin sonuçları diğer biyolojik test sistemleri ile de iyi korelasyon göstermektedir. Bu test sisteminde büyüme ve EC₅₀ gibi makroskobik, Mİ ve KA'lar (c-mitoz, kalgın kromozom, yapışıklık v.s) gibi mikroskobik parametreler kolaylıkla değerlendirilebilmektedir (Fiskesjö 1985, Caritá and Marin-Morales 2008, Chaparro *et al.* 2010, Mauro *et al.* 2014, Liman *et al.* 2015, 2019, Palmieri *et al.* 2016, Rahman *et al.* 2017).

Komet testi ya da tek hücre jel elektroforezi; basit, hızlı, duyarlı, nispeten düşük maliyetli olması ve az sayıda hücreden güçlü sonuçlar elde edilebilmesinden dolayı kimyasalların genotoksitesilerinin belirlenmesi için geliştirilmiş iyi bir tekniktir. *A. cepa* kök meristem hücreleri *Allium* testindeki mitozdan bağımsız olarak Komet testi ile DNA hasarını tespit etmek için de kullanılmaktadır (Gichner *et al.* 2009, Liman 2013, Kaya *et al.* 2015, Santos *et al.* 2015, Dhawan and Anderson 2016, Jana *et al.* 2017, Kaygisiz and Çiğerci 2017, Küçük and Liman 2018).

Bu çalışmada pyridabenin ticari formu olan PİP'in *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerinde sitogenetik ve

genotoksik etkileri *Allium* ana-telofaz ve Komet testi ile araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

A. cepa (2n=16) ticari olarak süpermarketten, PİP ise Safa Tarım Konya'dan temin edilmiştir. Bazik Fuksin (CAS No 569-61-9), MMS (CAS No 66-27-3), Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMPA, CAS No 39346-81-1), Normal Erime Noktalı Agaroz (NMPA, CAS No 9012-36-6), Trizma Baz (CAS No 77-86-1), Etilendiamintetraasetik asit (CAS No 6381-92-6), Sodyum Hidroksit (CAS No 1310-73-2), Trizma Hidroklorik Asit (CAS No 1185-53-1), Sodyum Klorür (CAS No 7647-14-5), Potasyum Klorür (CAS No 7447-40-7), Sodyum Fosfat Dibazik-Heptahidrat (CAS No 7782-85-6), Potasyum Fosfat Monobazik (CAS No 7778-77-0), Triton-X100 (CAS No 9002-93-1), Magnezyum Klorür Hekzahidrat (CAS No 7791-18-6), Etidyum Bromür (CAS No 1239-45-8), Hidroklorik Asit (CAS No 7647-01-0), Asetik Asit (CAS No 64-19-7), Etanol (CAS No 64-17-5) ve Potasyum Disülfid (CAS No 16731-55-8) Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır.

2.1 *Allium* ana-telofaz testi

2.1.1. Büyüme Engelleme Testi

Büyüme engelleme testi Fiskesjö (1985) metodunda bazı değişiklikler yapılarak PİP'in *A. cepa* kök meristem hücrelerinde EC₅₀ değeri belirlenmiştir. Yaklaşık aynı büyüklükteki soğanların (1-2 cm çapında) kahverengi kabukları soyulmuş ve çimlenmiş olan kökleri, kök primordiyalarına zarar vermeyecek şekilde temizlenmiştir. PİP'in çeşitli konsantrasyonları (25, 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 ppm) ve distile su (negatif kontrol grubu) karanlık ortamda oda sıcaklığında (~21°C ± 4 °C) 96 saat boyunca çimlenmeye bırakılmıştır. Çözeltiler her gün yenilenmiştir. Uygulama grupları için beşer tane soğan kullanılmıştır. Süre sonunda her bir soğandan onar adet olmak üzere toplamda ellışer kök alınarak ortalama kök uzunlukları belirlenmiştir.

2.1.2. Mitotik Aktivite ve Kromozom Anormalliklerin Belirlenmesi

Soğanların köklerini 2-3 cm uzunluğuna ulaşmasını sağlamak için 2 gün boyunca distile suda köklendirildikten sonra; PİP'in 2xEC₅₀, EC₅₀ ve

1/2xEC₅₀ konsantrasyonları, distile su (negatif kontrol) ve MMS (10 ppm, pozitif kontrol) 24,48,72 ve 96 saat boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında çimlendirilmeye bırakılmıştır. Uygulama grupları için üçer adet soğan kullanılmıştır. Tespit işlemi için her bir uygulama için 15-20 kök yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilerek 4 °C'de Carnoy fiksatifinde 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda kökler % 70'lik alkol içerisine alınarak 4 °C'de deney yapıncaya kadar bekletilmiştir. Mİ ve KA'ların belirlenmesinde bu kök uçları kullanılmıştır. Kök uçları distile su ile yıkandıktan sonra 1 N HCl ile 60 °C'de 8-10 dakika bekletilerek hidrolize edilmiştir. Kökler distile su ile tekrar yıkanarak oda sıcaklığında Feulgen tekniği ile 25-30 dakika boyanmıştır. Koyu boyanan kök uçları kesilerek %45'lik asetik asit ile ezme preparatları yapılmış ve tırnak cilası ile yarı daimi hale getirilmiştir. Mİ ve KA'ların tespiti Saxena *et al.* (2005)'a göre CMOS kamera (Argenit, Kameram5, Türkiye) ataçmanlı Nikon Eclipse Ci-L ışık mikroskobu (Japonya) ile yapılmıştır. Her bir uygulama için 5000-6000 (preparat başına 1000-1200) hücre sayılarak, sayılan hücreler arasında mitoz girenlerin yüzdesi hesaplanarak Mİ değeri hesaplanmıştır. Her bir uygulama için 500 anafaz hücre (Slayt başına 100 hücre) sayılarak KA'lar (bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, anafaz köprüsü ve poliploidi) belirlenerek fotoğrafları x40 objektifte çekilmiştir. Mİ ve KA aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$Mİ = \left(\frac{\text{Mitoza girmiş hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \right) \times 100$$

$$KA = \left(\frac{\text{Toplam anormal Hücre}}{\text{Toplam sayılan ana-telofaz hücre sayısı}} \right) \times 100$$

2.2 Komet testi

Komet testi Tice *et al.* (2000) metodunda bazı değişiklikler yapılarak DNA hasarını belirlemek için yapılmıştır. 2.1.2'de belirtildiği gibi *A. cepa* kökleri, hazırlanan uygulama gruplarına belirtilen sürelerde maruz bırakılmışlardır. Süreler sonunda soğanlardan her konsantrasyon için her soğandan yedişer kök kesilmiştir. Her bir uygulama için üç tekrar yapılmıştır. Nukleus izolasyonu Liman *et al.* (2015)'a göre yapılmıştır. 50 µL örnek, 50 µL %1.5'lik LMPA ile 37 °C'de karıştırıldıktan sonra daha önceden %1'lik

NMPA ile kaplanmış lamlara yayılarak üzeri lamelle kapatılmıştır. İşlem sonunda buz kasetleri üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. Örnekler elektroforez tankına alınarak elektroforez tampon çözeltisi (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH>13) içinde cihaz çalıştırılmadan 4 °C'de 25 dakika bekletilmiştir. Ardından 25V, 300 mA'da 20 dakika 4 °C'de elektroforez edilmiştir. Preparatlar 5 dakika distile suda bekletildikten sonra 0.4 M Tris (pH 7.5) çözeltisi ile üç kez beşer dakika aralıklarla nötrale edilmiştir. Her bir preparat 70 µL Etidyum Bromür (20 µg/mL) ile 5 dakika boyanmıştır. CCD kamera (BAB, TC-5, Türkiye) ataçmanlı Floresan mikroskobu (BAB, TAM-F, Türkiye) kullanılarak her bir slaytta 50 komet görsel olarak Koçyigit *et al.* (2005)'a göre değerlendirilmiştir (0-hasarsız, 1-hafif hasar, 2-orta hasar, 3-ciddi hasar, 4- tam hasar). DNA hasarının derecesi ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

$$\text{Arbitrary unit} = \sum_{i=0}^4 Ni * i$$

Ni = I derecesindeki hücrelerin sayısı; i = hasar derecesi (0, 1, 2, 3, 4)

2.3 İstatistiksel değerlendirme

Sonuçların (ortalama ± standart sapma) karşılaştırılması SPSS 23.0 for Windows paket programında Duncan çoklu dağılım testi ile yapılmıştır (P<0.05). Doz-cevap ve süre-cevap ilişkisi ise Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1. Büyüme Engelleme Testi

Bu testte PİP'in çeşitli konsantrasyonları ve saf su (negatif kontrol) 96 saat boyunca çimlenmeye bırakılarak ortalama kök uzunlukları belirlenmiştir. Kontrol grubundan ortalama kök uzunluğu 3.5±0.11 cm iken PİP'in uygulanan konsantrasyonlarında bu değer 2.93±0.12 ile 0.94±0.07 cm arasında değişmektedir. Azalan bu değerler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 1). PİP'in EC₅₀ değeri 100 ppm olarak bulunmuştur. PİP'in uygulanan bütün dozları ortalama kök uzunluğunu doza bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak azaltmıştır (r=-0,977 p=0,01). 200 ppm'lik uygulamada kontrol grubuna göre %67,92 oranında azalma tespit edilmiştir.

3.2. PİP'in Mitotik İndeks ve Kromozom Anormallikleri Üzerine Etkisi

PİP'in *A. cepa* kök hücrelerindeki Mİ ve mitotik fazlara olan etkisi Çizelge 2'de gösterilmiştir. PİP'in uygulanan tüm dozları, Mİ değerini, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır. Bu azalışlar hem doza bağlı (24 saat için $r=-0.98$ $p=0.01$, 48 saat için $r=-0.95$ $p=0.01$, 72 saat için $r=-0.877$ $p=0.01$ ve 96 saat için $r=-0.953$ $p=0.01$) hem de zamana bağlı olarak (50 ppm için $r=-0.981$ $p=0.01$, 100 ppm için $r=-0.981$ $p=0.01$ ve 200 ppm için $r=-0.964$ $p=0.01$) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. PİP'in en yüksek Mİ değerine 24 saatlik uygulamadaki 50 ppm'lik konsantrasyonunda (69.23 ± 0.32), en düşük Mİ değerine ise 96 saatlik uygulamadaki 200 ppm'lik konsantrasyonunda (55.38 ± 0.31) görülmüştür. PİP'in uygulanan tüm

dozları profaz indeksini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaltmışken telofaz indeksini arttırmıştır.

Çizelge 1. PİP'in *A. cepa* köklerinde büyümeyi engelleme testi sonuçları

	Ortalama uzunluk $cm\pm SS^*$	% Büyüme	% Büyümede azalma
Kontrol	3.5 \pm 0.11a	100	0
25	2.93 \pm 0.12b	83,71	16,29
50	2.43 \pm 0.09c	69,43	30,57
75	2.06 \pm 0.12d	58,86	41,14
100	1.76\pm0.13e	50,29	49,71
125	1.58 \pm 0.12f	45,14	54,86
150	1.28 \pm 0.11g	36,57	63,43
200	0.94 \pm 0.07h	32,08	67,92

*Sütunlardaki farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart sapma

Çizelge 2. PİP'in *A. cepa* kök hücrelerindeki Mİ ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon (ppm)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks $\pm SS$	Mitotik Faz Safhaları (%) $\pm SS^*$			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5080	71.69 \pm 0.61a	89.35 \pm 0.79a	1.81 \pm 0.19a	2.45 \pm 0.28a	6.39 \pm 0.6a
MMS-10	5152	58.92 \pm 0.44b	85.01 \pm 0.18b	2.68 \pm 0.18b	2.81 \pm 0.15b	9.49 \pm 0.28b
50	5116	69.23 \pm 0.32c	86.51 \pm 0.28c	1.92 \pm 0.07a	2.26 \pm 0.16a	9.32 \pm 0.15b
100	5085	66.45 \pm 0.12d	87.51 \pm 0.38d	1.57 \pm 0.17c	1.36 \pm 0.12c	9.56 \pm 0.26b
200	5121	62.26 \pm 0.84e	87.20 \pm 0.16d	1.54 \pm 0.15c	1.63 \pm 0.1d	9.63 \pm 0.19b
Kontrol- 48 saat	5132	70.46 \pm 0.87a	89.37 \pm 0.66a	1.83 \pm 0.14a	2.36 \pm 0.25a	6.44 \pm 0.31a
MMS-10	5137	56.92 \pm 0.68b	85.43 \pm 0.29b	2.39 \pm 0.17b	2.6 \pm 0.13b	9.57 \pm 0.21b
50	5101	65.18 \pm 0.64c	86.6 \pm 0.33c	1.86 \pm 0.13a	2.22 \pm 0.12a	9.32 \pm 0.26b
100	5074	63.52 \pm 0.39d	87.71 \pm 0.07d	1.46 \pm 0.21c	1.24 \pm 0.16c	9.59 \pm 0.2b
200	5120	60.45 \pm 0.73e	87.98 \pm 0.41d	1.2 \pm 0.18d	1.16 \pm 0.15c	9.66 \pm 0.33b
Kontrol-72 saat	5167	70.66 \pm 0.88a	89.23 \pm 0.31a	1.85 \pm 0.12ab	2.4 \pm 0.16a	6.52 \pm 0.33a
MMS-10	5183	53.69 \pm 0.62b	85.53 \pm 0.39b	2.07 \pm 0.28a	2.32 \pm 0.2a	10.07 \pm 0.42b
50	5094	62.34 \pm 0.84c	86.51 \pm 0.45c	1.71 \pm 0.21b	1.93 \pm 0.19b	9.86 \pm 0.42b
100	5081	61.45 \pm 0.55c	87.76 \pm 0.52d	1.41 \pm 0.12c	1.19 \pm 0.21c	9.64 \pm 0.59b
200	5098	58.36 \pm 0.81d	88.33 \pm 0.33e	0.98 \pm 0.14d	0.81 \pm 0.13d	9.88 \pm 0.19b
Kontrol- 96 saat	5170	71.6 \pm 0.85a	89.21 \pm 0.31a	1.85 \pm 0.18a	2.43 \pm 0.22a	6.51 \pm 0.28a
MMS-10	5212	50.42 \pm 0.92b	85.52 \pm 0.37b	1.80 \pm 0.25a	2.23 \pm 0.27a	10.45 \pm 0.43b
50	5148	59.79 \pm 0.64c	86.45 \pm 0.55c	1.59 \pm 0.24a	1.78 \pm 0.12b	10.18 \pm 0.59b
100	5128	57.16 \pm 0.75d	88.33 \pm 0.66d	0.85 \pm 0.24b	0.89 \pm 0.15c	9.93 \pm 0.65b
200	5204	55.38 \pm 0.31e	88.03 \pm 0.45d	0.83 \pm 0.14b	0.76 \pm 0.2c	10.38 \pm 0.24b

*Sütunlardaki farklı küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

PİP'in *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde anormallik 96 saatlik uygulamanın 200 ppm'lik indüklediği toplam KA'lara bakıldığında en fazla dozunda (%14.8 \pm 0,54), en az anormallik olayına ise

24 saatlik uygulamanın 50 ppm'lik dozunda (%7.8±0.45) rastlanılmıştır (Çizelge 3). Uygulanan süre ve artan dozlara göre toplam anormalliklerdeki yüzde değişimler, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Toplam KA'larda doza (24 saat için $r=0.9$ $p=0.01$; 48 saat için $r=0.833$ $p=0.01$; 72 saat için $r=0.529$ $p=0.05$ ve 96 saat için $r=0.8$ $p=0.01$) ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir (50 ppm için $r=0.94$ $p=0.01$, 100 ppm için $r=0.915$ $p=0.01$ ve 200 ppm için $r=0.954$ $p=0.01$). PİP'in 200 ppm'lik dozundaki toplam anormallikler 24 saatlik uygulama hariç pozitif kontrol grubu olan MMS'den yüksek bulunmuştur ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PİP'in ana-telofaz safhasında neden olduğu anormallikler; bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, anafaz köprüsü ve poliploidir (Şekil 2). PİP'in indüklediği bozulmuş ana-telofaz (%3.6, 200 ppm 96 saat) en fazla gözüken anormallik iken anafaz köprüsü (%0.8,

100 ppm 24 saat) en az gözüken anormallik ise anafaz köprüsüdür (%0.8, 100 ppm 24 saat).

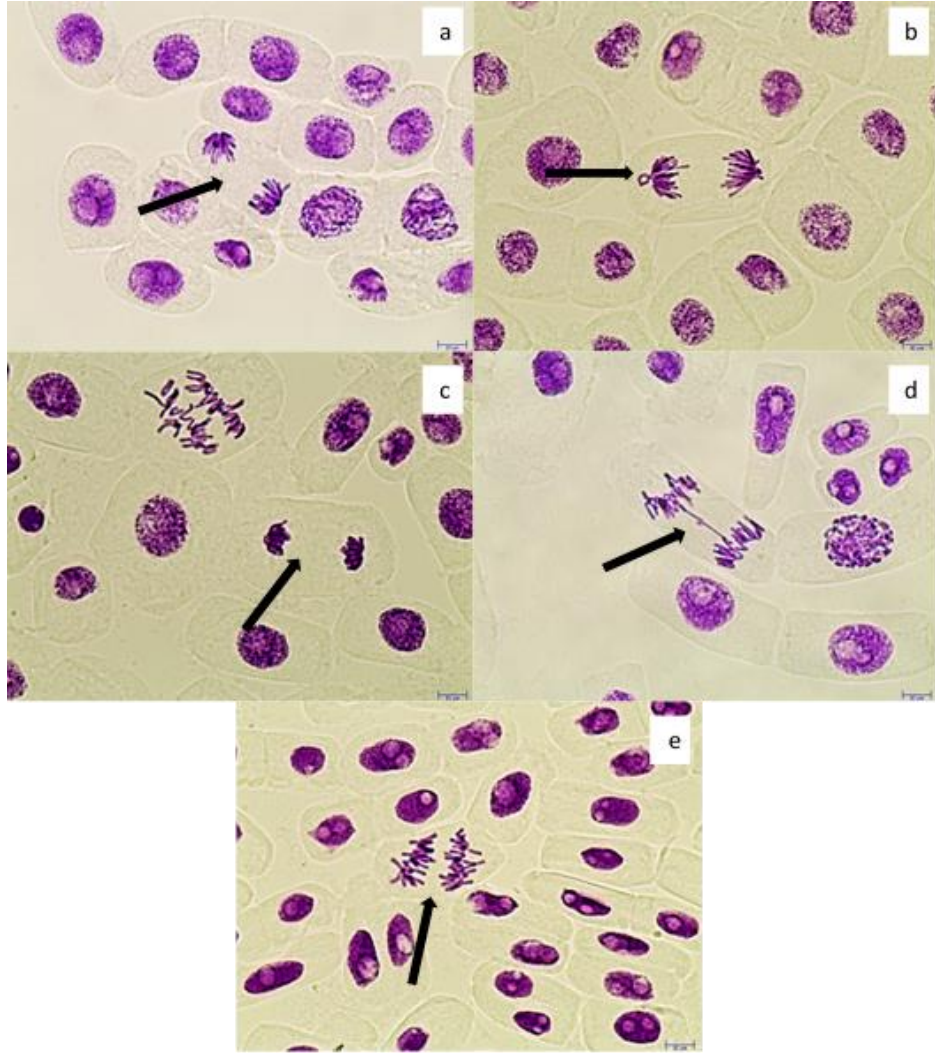
3.2. Komet Testi Sonuçları

Komet testi PİP'in *A. cepa* kök meristematik hücreleri üzerinde oluşturduğu DNA hasarını belirlemek için yapılmıştır (Çizelge 4). PİP'in bütün dozları DNA hasarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttırmış olup bu artışlar hem doza (24 saat için $r=0.989$ $p=0.01$; 48 saat için $r=0.98$ $p=0.01$; 72 ve 96 saat için $r=0.956$ $p=0.01$ hem de zamana (50 ppm için $r=0.983$ $p=0.01$, 100 ppm için $r=0.947$ $p=0.01$ ve 200 ppm için $r=0.93$ $p=0.01$) bağımlı bulunmuştur. Ancak bu artışlar pozitif kontrol grubu olan MMS'den düşük bulunmuştur. PİP'in oluşturduğu en yüksek DNA hasarına 200 ppm'lik dozun 96 saatlik uygulamasında (121±4), en düşük DNA hasarına ise 50 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (43±2) rastlanılmıştır.

Çizelge 3. PİP'in *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde indüklediği KA'lar

Konsantrasyon (ppm)	İncelenen Hücre Sayısı	Ana-telofazdaki Anormallikler (%)					Toplam Anormallikler (%± SS)
		Bozulmuş anafaz-telofaz	Kalgın kromozom	Yapışkanlık	Anafaz köprüsü	Poliploidi	
Kontrol- 24 saat	500	0,8	0,6	0,8	0,4	0,6	3,2±0,45a
MMS-10	500	2,4	2,4	3	1,4	1,4	10,6±0,89b
50	500	2	1,4	2	1,4	1	7,8±0,45c
100	500	2,4	1,8	3	0,8	1	9±0,71d
200	500	2,6	1,8	3	1,4	1,2	10±0b
Kontrol- 48 saat	500	1	0,8	1	0,4	0,6	3,8±0,45a
MMS-10	500	3,6	2,4	2,2	2,2	1,2	11,6±0,55b
50	500	2,2	1,8	2,2	1,4	1,4	9±1c
100	500	2,8	2,6	2,4	1,8	1,6	11,2±0,84b
200	500	3,2	2,4	3,2	2	1,4	12,2±0,84b
Kontrol-72 saat	500	0,8	0,6	0,6	0,6	0,8	3,4±0,55a
MMS-10	500	3	2,6	2,8	3,2	1,6	13,2±0,84b
50	500	2,6	2,6	3,4	2	1,8	12,4±0,55b
100	500	2,8	2,8	3	2,8	1,6	13±1b
200	500	2,2	3,4	3,2	2,4	2,2	13,4±0,55b
Kontrol- 96 saat	500	0,6	1	0,4	0,6	0,6	3,2±0,84a
MMS-10	500	2,8	3,2	2,6	3	2,8	14,4±0,55bc
50	500	2,4	2,2	3	3	2,6	13,2±0,45b
100	500	3	3	2,8	2,6	2,6	14±0,71c
200	500	2	3,6	3,4	2,4	3,4	14,8±0,45c

* Sütunlardaki farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma



Şekil 2. PİP'e maruz bırakılmış *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anafaz-telofaz anormallikleri a: Bozulmuş ana-telofaz, b: Kalgın kromozom, c: Yapışkanlık, d: Anafaz köprüsü, e-Poliploidi

Çizelge 4. PİP'in *A. cepa* kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	-	2,33±0,58a	4,33±0,58a	6,33±0,58a	6±1a
MMS	10	132,33±4,51b	143,67±1,53b	146,67±2,89b	158,33±3,51b
	50	43±2c	52,67±0,58c	63,33±3,06c	73,33±3,51c
PIP	100	65,33±1,53d	70,67±2,52d	75±2d	86±3d
	200	101±2,65e	106,67±2,08e	110,33±2,08e	121±4e

* Sütunlardaki farklı harfler p < 0,05 düzeyinde önemli Duncan çoklu dağılım testi)

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma ile PİP'in *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerinde oluşturduğu sito-genotoksik etkileri *Allium* ana-telofaz testi ile belirlenmiştir. Büyüme engelleme testi kullanılarak PİP'in EC₅₀ değeri 100 ppm (%50,29) olarak bulunmuştur. PİP'in kullanılan bütün dozları ortalama kök uzunluğunu istatistiksel olarak azaltmıştır. Kök büyümesinin engellemesi apikal meristematik aktivite (Webster and MacLeod

1996), farklılaşma sırasındaki hücre uzaması (Fusconi *et al.* 2006) ya da farklılaşma sırasında hücre duvarının kaybolmasını ve uzamasını uyaran enzim aktivitesi ile alakalı olabilir (Silveira *et al.* 2017). *Neoseiulus womersleyi* ve *Phytoseiulus persimilis* için LC₅₀ değerleri sırasıyla 178.7 ve 98.1 mg/kg (Park *et al.* 2011), *Tetranychus urticae* için 20446.5 ppm (Kim *et al.* 2006), *Eisenia fetida* için ise 0.55 µg/cm² (Wang *et al.* 2012) bulunmuştur. LD₅₀ değeri *Rana nigromaculata* için 2716.1±437.8

mg/kg, *Bufo bufo* için ise 4074.7±614.8 mg/kg bulunmuştur (Sicai and Hongbin 1995). IC₅₀ değeri HepG2 hücre hatlarında 1000 µM'dan daha fazladır (Ma *et al.* 2016).

PİP'in uygulanan tüm konsantrasyonları uygulama sürelerince Mİ'yi istatistiksel olarak azaltmıştır. Mİ'nin azalması PİP'in *A. cepa* kök hücrelerine sitotoksik etki gösterdiğinin göstergesidir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında profaz indeksi azalmışken telofaz indeksi istatistiksel olarak artmıştır. Mİ'deki anlamlı azalma G₁ fazının bloke edilmesi, S fazında DNA sentezinin baskılanması ya da inhibisyonu (Sudhakar *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2018) veya G fazının bloke edilmesi (El-Ghamery *et al.* 2000) gibi hücre siklusunun bozulmasından ya da mitotik faz süre değişikliklerinden (Saxena *et al.*) kaynaklanabilir. Ayrıca hücre siklusunda görev alan spesifik proteinlerin inhibisyonu (Hidalgo *et al.* 1989) ve ROS oluşumu da (Livanos *et al.* 2017) benzer etki yapmaktadır. Çalışmamızdan farklı olarak pyridaben insan lenfositlerinde istatistiksel olarak Mİ'yi değiştirmemiştir (Dönbak 2017).

PİP ana-telofazdaki toplam KA'ları (bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, anafaz köprüsü ve poliploidi) hem doza hem de zamana bağlı olarak arttırmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. PİP toplam KA'ları artırarak *A. cepa* kök hücrelerine genotoksik etki göstermiştir. Bozulmuş ana-telofaz (Şekil 2a) ve kalgın kromozom (Şekil2b), kromozomların kutuplara tam olarak hareket edememesi, iğ yapısının deformasyonundan ya da bozulmuş mikrotübüllerden kaynaklanabilir (Evseeva *et al.* 2005, Kumari *et al.* 2009, Singh and Roy 2017). Genellikle kromozomlar üzerinde geri dönüşümsüz etkiye sebep olan yapışkanlık (Şekil 2c); DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur. Artan kromozom kısalması ve yoğunlaşması, muhtemelen DNA'nın depolimerizasyonu ve nükleoproteinlerin kısmi çözünmesinden veya kromatin liflerinin ekstra kromozomal ile iç içe geçmesinden kaynaklanabilir (Fiskesjö and Levan 1993, Türkoğlu 2015, El-Ghamery and Mousa 2017). Kullanılan kimyasal maddelerin klastojenik etkisi sonucu kromozomların kırılması ya da füzyonu, eşit olmayan kromatid değişimi, disentrik kromozomdan dolayı, replikasyon enzimlerinin aktivasyonunun

değiştirilmesinden veya yapışkanlıktan dolayı oluşabilen (El-Ghamery *et al.* 2000, Luo *et al.* 2004) anafaz köprüsüne (Şekil 2d) en çok 72 saatlik uygulama süresinin 100 ppm'lik konsantrasyonunda (%2.8) tespit edilmiştir. Poliploidi (Şekil 2e) sitokinezin normal işleyişinin bozulması sonucu fragmoplast oluşumunda zorluklara yol açabilir (Fernandes *et al.* 2007). Pyridabenin 5, 10, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonları insan periferik lenfositlerinde KA'yı, kardeş kromatid değişimini ve mikronükleus oluşumunu uyararak genotoksik etki göstermiştir (Dönbak 2017). Pyridaben ST486 ve EW36 hücre hatlarında apoptozisi indüklemiştir (Bloom *et al.* 2005). EFSA'ya (2010) göre pyridaben genotoksik, karsinojenik, nörotoksik ya da üreme toksisitesini göstermemektedir. Igarashi ve Sakamoto (1994) ticari şirketlerin verilerine dayanarak pyridabenin bakteriyel ve memeli test sistemlerinde nokta mutasyonlarını, *in vitro* KA'ları, *in vivo* mikronükleus oluşumunu ve bakteriyel test sistemlerinde DNA hasarını uyardıklarını belirtmişlerdir.

PİP DNA hasarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttırmış fakat bu artışlar MMS'den düşük bulunmuştur. Pyridaben Balb/C farelerinde DNA hasarını ve kromatin anormalliklerini (Manas *et al.* 2013a), ROS ve NOS seviyelerini (Manas *et al.* 2013b, 2014) istatistiksel olarak arttırmıştır. Aynı zamanda N27 hücrelerinde 60 ve 180 dakikalık 3 µM pyridaben uygulanması ROS oluşumu indüklemiştir (Charli *et al.* 2016). S-K-N-MC neuroblastoma hücrelerinde 10 nmol/L pyridaben aynı miktardaki rotenona göre oksidatif hasarı daha fazla oranda arttırmıştır (Sherer *et al.* 2007). Pyridabenin oluşturduğu DNA hasarı mitokondriyel elektron taşıma sistemindeki Kompleks I'in inhibe edilerek ROS miktarının artmasından kaynaklanabilir (ST-Pierre *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003).

Sonuç olarak PİP, *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde sitotoksik etki göstererek kök büyümesini ve Mİ'yi azaltmakla beraber genotoksik etki göstererek KA'ları ve DNA hasarını arttırmıştır. PİP kullanımına dikkat edilmeli ve sito-genotoksik etkileri diğer test sistemleri ile de araştırılmalıdır.

5. Kaynaklar

- Bloom, S.E., Lemley, A.T. and Muscarella, D.E., 2005. Potentiation of apoptosis by heat stress plus pesticide exposure in stress resistant human B-lymphoma cells and its attenuation through interaction with follicular dendritic cells: role for c-Jun N-terminal kinase signaling. *Toxicological Sciences*, **89**, 214-223.
- Bose, A. and Beal, M.F., 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. **139**, 216-231.
- Caritá, R. and Marin-Morales, M.A., 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes *Chemospher.* **72**, 722-725.
- Chaparro, T.R., Botta C.M. and Pires, E.C., 2010. Biodegradability and toxicity assessment of bleach plant effluents treated anaerobically. *Water Science and Technology*, **62**, 1312-1319.
- Charli, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A. and Kanthasamy, A.G., 2016. Alterations in mitochondrial dynamics induced by tebufenpyrad and pyridaben in a dopaminergic neuronal cell culture model. *Neurotoxicology*, **53**, 302-313.
- Chen, Q., Vazques, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L. and Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36027–36031.
- Dhawan, A., and Anderson, D., 2016. The comet assay in toxicology (Vol. 30). Second Edition. Royal Society of Chemistry. 3-64.
- Dönbak, D.B., 2017. İnsan periferik lenfositlerinde pyridaben insektisitinin ka, kkd ve mn testleri ile genotoksitesinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 88.
- El-Ghamery, A.A. and Mousa, M.A., 2017. Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radicle growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L. *Annals of Agricultural Sciences*, **62**, 11-21.
- El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I. and Mansour, M.M., 2000. The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, **65**, 277–287.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyridaben. *EFSA Journal*, **8**, 1632.
- Evseeva, T.I. Geras'kin, S.A., Shuktomova, I.I. and Taskaev, A.I., 2005. Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia), *Journal of Environmental Radioactivity*, **80**, 59–74.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C. and Marin-Morales, M.A., 2007. mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 252-259.
- Fiskesjö, G. and Levan, A., 1993. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test. *Alternatives to Laboratory Animals*, **21**, 139–149.
- Fiskesjö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102**, 99-112.
- Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E. and Berta, G., 2006. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, **58**. 253-260.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D. and Plewa, M.J., 2009. The use of higher plants in the Comet assay, A. Dhawan. D. Anderson. the Comet Assay in Toxicology. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Ukrayna. (pp. 98–119).
- Gomez, C., Bandez, M.J. and Navarro, A., 2007. Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Frontiers in Bioscience*, **12**, 1079–1093.
- Gupta, K., Mishra, K., Srivastava, S. and Kumar, A., 2018. Cytotoxic assessment of chromium and arsenic using chromosomal behavior of root meristem in *Allium cepa* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **100**, 803-808.
- Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G., 1989. Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chlorprophan. *Cytobios*, **57**, 7–14.
- Igarashi, H. and Sakamoto, S., 1994. Summary of toxicity studies with pyridaben, *Journal of Pesticide Science*, **29**, 243-251.
- Jana, A., Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A. and Mukherjee, A., 2017. Hazard identification of coal fly ash leachate using a battery of cytogenotoxic and biochemical tests in *Allium cepa*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **63**, 1443-1453.
- Kaya, N., Çakmak, I., Akarsu, E. and Kaya, B., 2015. DNA damage induced by silica nanoparticle. *Fresenius Environmental Bulletin*, **24**, 4478-4484.

- Kaygisiz, Ş.Y. and Ciğerci, İ.H., 2017. Genotoxic evaluation of different sizes of iron oxide nanoparticles and ionic form by SMART, Allium and comet assay. *Toxicology and Industrial Health*, **33**, 802-809.
- Kim, M., Sim, C., Shin, D., Suh, E. and Cho, K., 2006. Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychus urticae*. *Crop Protection*, **25**, 542-548.
- Kocuyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. and Erel, O., 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **585**, 71-78.
- Kumari, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of The Total Environment*, **407**, 5243-5246.
- Küçük, D. and Liman, R., 2018. Cytogenetic and genotoxic effects of 2-chlorophenol on *Allium cepa* L. root meristem cells. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 6117-36123.
- Liman, R., 2013. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. *Chemosphere*, **93**, 269-273.
- Liman, R., Ciğerci, İ.H. and Öztürk, N.S., 2015. Determination of genotoxic effects of imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **118**, 38-42.
- Liman, R., Acikbas, Y. and Ciğerci, İ.H., 2019. Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by allium and comet tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **168**, 408-414.
- Livanos, P., Galatis, B., Quader, H. and Apostolakos, P., 2017. ROS homeostasis as a prerequisite for the accomplishment of plant cytokinesis. *Protoplasma*, **254**, 569-586.
- Luo, L.Z., Werner, K.M., Gollin, S.M. and Saunders, W.S., 2004. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **554**, 375-385.
- Ma, M., Chen, C., Yang, G., Li, Y., Chen, Z. and Qian, Y., 2016. Combined cytotoxic effects of pesticide mixtures present in the Chinese diet on human hepatocarcinoma cell line. *Chemosphere*, **159**, 256-266.
- Manas, G.E., Parivar, K., Hasanzadeh, S., Yaghmayi, P. and Najafi, G., 2014. The effects of pyridaben pesticide on gonadotropic, gonadal hormonal alternations, oxidative and nitrosative stresses in Balb/C mice strain. *Comparative Clinical Pathology*, **23**, 297-303.
- Manas, G.E., Hasanzadeh, S., Najafi, G., Parivar, K. and Yaghmaei, P., 2013a. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early *in vitro* embryonic development in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, **11**, 605-610.
- Manas, G.E., Hasanzadeh, S. and Parivar, K., 2013b. The effects of pyridaben pesticide on the histomorphometric, hormonal alternations and reproductive functions of BALB/c mice. *Iranian journal of Basic Medical Sciences*, **16**, 1055-1064.
- Mauro, M.O., Pesarini, J.R., Marin-Morales, M.A., Monreal, M.T.F.D., Monreal, A.C.D., Mantovani, M.S. and Oliveira, R.J., 2014. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research*. **13**, 4808-4819.
- Palmieri, M.J., Andrade-Vieira, L.F., Trento, M.V.C., de Faria Eleutério, M.W., Lubber, J., Davide, L.C. and Marcussi, S., 2016. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, **227**, 156-166.
- Park, J.J., Kim, M., Lee, J.H., Shin, K.I., Lee, S.E., Kim, J.G. and Cho, K., 2011. Sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on two predatory mite species, *Neoseiulus womersleyi* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari, Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*, **54**, 243-259.
- Rahman, M.M., Rahman, M.F. and Nasirujjaman, K., 2017. A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the *Allium cepa* test. *Chemistry and Ecology*, **33**, 434-446.
- Rand, G.M. and Clark, J.R., 2000. Hazard/risk assessment of pyridaben: I. Aquatic toxicity and environmental chemistry. *Ecotoxicology*, **9**, 157-168.
- Santos, C.L., Pourrut, B. and Oliveira, J.M.P., 2015. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*, **6**, 216.
- Saxena, P.N., Chauhan, L.K.S. and Gupta, S.K., 2005. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, **216**, 244-252.
- Sherer, T.B., Richardson, J.R., Testa, C.M., Seo, B.B., Panov, A.V., Yagi, T. and Greenamyre, J.T., 2007. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of

- Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, **100**, 1469–1479.
- Sicai, H. and Hongbin, T., 1995. Study on the acute toxicity of three acaricides to frog and toad. *Pesticides*, **6**, 14-22.
- Silveira, G.L., Lima, M.G.F., dos Reis, G.B., Palmieri, M.J. and Andrade-Vieria, L.F., 2017. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*, **178**, 359-367.
- Singh, D. and Roy, B.K., 2017, Evaluation of malathion-induced cytogenetical effects and oxidative stress in plants using *Allium* test. *Acta Physiologiae Plantarum*, **39**, 92-102.
- ST-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. and Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 44784–44790.
- Sudhakar, R., Ninge Gowda, K.N. and Venu, G., 2001. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. *Cytologia*, **66**, 235-239.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. and Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221.
- Türkoğlu, Ş., 2015. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Toxicology and Industrial Health*, **31**, 792-801.
- Wang, Y., Wu, S., Chen, L., Wu, C., Yu, R., Wang, Q. and Zhao, X., 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. **88**, 484-491.
- Webster, P.L. and Macleod, R.D., 1996. The root apical meristem and its magrin. In: Waishel. Y.. Eshel. A.. Kafkafi. U.. Plant roots. The hidden half (Second Ed.), Marcel Dekker, New York. **51**, 76-79.
- Yu, S.J., 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Taylor and Francis group, New York. ISBN. 25-85.

İnternet kaynakları

- 1-<http://www.safatarim.com/PDF/Documents/138-primate-20-wp-primate-20-wp---brosur.pdf>
(18.12.2018)