



Alınış tarihi (Received): 06.09.2018
Kabul tarihi (Accepted): 13.12.2018

Baş editör/Editors-in-Chief: Ebubekir ALTUNTAŞ
Alan editörü/Area Editor: Köksal PABUÇCU/Bülent TURAN

Allium cepa L.' da Krom ($K_2Cr_2O_7$)'un Toksik Etkilerinin Araştırılması

Nurşah OCAK GÜLER^a Kültiğın ÇAVUŞOĞLU^{b,*} Emine YALÇIN^b

^aGiresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, 28200, Giresun-Türkiye

^bGiresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28200, Giresun-Türkiye

*Sorumlu yazar, e-posta: kultigincavusoglu@mynet.com

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 mikronükleus (MN) sıklığı, kromozomal aberasyonlar ve mitotik indeks (MI) ele alınmıştır. $K_2Cr_2O_7$ uygulaması ile çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, ağırlık artışı ve MI oranlarının azaldığı, MN sıklığı ve kromozomal hasarların ise 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 yassılaştırmış hücre çekirdeği, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu ve nekroz şeklinde anatomik hasarlara neden olmuştur. Sonuç olarak, $K_2Cr_2O_7$ 'nin *A. cepa*'da fizyolojik, sitogenetik ve anatomik açıdan ciddi toksik etkilere neden olduğu, bu etkinin de doza bağımlı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler – *Allium cepa* L., $K_2Cr_2O_7$, kromozomal hasar, mikronükleus, mitotik indeks

Investigation of Toxic Effects of Chromium ($K_2Cr_2O_7$) in *Allium Cepa* L

ABSTRACT: In this study, physiological, cytogenetic and anatomic effects of Chromium heavy metal ($K_2Cr_2O_7$) with different doses were investigated in *Allium cepa* L. Germination percentage, root length and weight gain were investigated as physiological parameters; micronucleus (MN) frequency, chromosomal aberrations and mitotic index (MI) were investigated as cytogenetic parameters. It was determined that germination percentage, root length, weight gain and MI decreased, MN frequency and chromosomal aberrations increased with $K_2Cr_2O_7$ treatment. The most obvious toxic effect was observed in the group treated with 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ treatment. Unequal distribution of chromatin, fragment, sticky chromosome, chromosome bridge, c-mitosis and reverse polarization were observed as chromosomal aberrations induced by $K_2Cr_2O_7$. It was determined that the fragment formation was observed in a high rate while reverse polarization was observed in least as chromosome damage after $K_2Cr_2O_7$ application. In addition, $K_2Cr_2O_7$ treatment causes anatomical damages in the root tip meristemetic cells as flattened cell nuclei, thickening of the cortex cell wall, cell deformation and necrosis. In conclusion, $K_2Cr_2O_7$ has serious physiological, cytogenetic and anatomic toxic effects in *A. cepa* and it has been determined that this effect is dose dependent.

Keywords – *Allium cepa* L., $K_2Cr_2O_7$, chromosomal aberrations, micronucleus, mitotic index

1. Giriş

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 metaller, atom numarası 20'den fazla 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 da 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, pestisit ve yapay gübre kullanımı, boya sanayisi ve araba egzoz gazlarının salınımı yoluyla meydana gelmektedir (Duffus ve Worth, 1996; Baldwin ve Marshall, 1999; Kafadar ve Saygıdeğer, 2010; Gür ve ark. 2004).

Ağır metallerle, her türlü kontaminasyon, canlılarda çeşitli toksik etkiler meydana getirmektedir. Yüksek konsantrasyonlarına maruziyet hücre membranına zarar verebilir, enzim spesifitesini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları durdurabilir ve DNA'nın yapısını bozabilir. Ağır metalin toksik etkisi metalin türüne, konsantrasyonuna, ortam pH'ına ya da metal iyonlarının çözünürlüğüne göre farklılık göstermektedir (Volesky, 1990).

Ağır metaller arasında yer alan *Krom (Cr)* ise periyodik cetvelin VI B grubunda yer alan bir geçiş metalidir. Dünyada en fazla bulunan elementler arasında 7. sırada bulunmakta ve dünyada yılda yaklaşık 107 ton civarında Cr üretimi gerçekleştirilmektedir (Han ve ark. 2004). Deri işleme, paslanmaz çelik üretimi, boya pigmenti ve kromik asit üretimi gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılan Cr, geniş kullanım alanları nedeniyle ciddi kontaminasyonlara da yol açmaktadır (Shanker ve ark. 2005; Cervantes ve ark. 2001). Yüksek toksik özellik sergileyen Cr, canlı organizmalarda hücre membran yapısına zarar vermekte, mutasyona, organel fonksiyonunda bozulmalara ve metabolik yollarda da inhibisyona neden olmaktadır (Kimbrough ve ark. 1999). Cr maruziyeti sonucunda bitkilerde serbest radikaller oluşmakta ve bu radikaller hücrelerde makro moleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır (Vajpayee ve ark. 2001; Zayed ve Terry, 2003).

Bu çalışmada, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ kullanılarak Cr'nin muhtemel toksik etkileri fizyolojik, anatomik ve sitogenetik parametreler kullanılarak, *A. cepa* test materyali yardımıyla araştırılmıştır. Fizyolojik etkilerin belirlenmesinde; çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık artışı, sitogenetik parametrelerin belirlenmesinde; mitotik indeks (MI), kromozomal anormallik ve mikronukleus (MN) oluşumu indikatör olarak kullanılmıştır. Ayrıca $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ uygulamasının *A. cepa* kök ucu meristematik hücrelerinde oluşturduğu anatomik hasarlarda incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. K₂Cr₂O₇ Uygulaması

Kök ucu preparatlarının hazırlanmasında eşit büyüklükte *A. cepa* tohumları kullanılmıştır. Tohumlar 1 kontrol ve 3 uygulama grubu olmak üzere toplam 4 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 (Wei, 2004).

2.2. 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 (Atik ve ark. 2007).

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

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

2.3. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus (MN) ve Mitotik İndeks (MI) 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 (Staykova ve ark. 2005).

MN sıklığını tespit etmek için, uygulama gruplarının her birinden toplam olarak 1.000 hücre sayılmış ve hücrelerde MN tespiti Fenench ve ark. (2003)'ün ölçütleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca bir yapının MN sayılabilmesi için;

- MN parçaları şekil olarak yuvarlak veya oval olmalıdır.
- MN hücre çekirdeğinden tam olarak ayırt edilebilir olmalı ya da mikronukleer sınır nukleer sınırdan ayırt edilebilmelidir.
- 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 10.000 hücre sayılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak MI oranı belirlenmiştir.

Mitotik İndeks % = Mitoza Girmiş Hücre/Toplam Hücre Sayısıx100

2.4. 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 (Makbul ve ark. 2008).

2.5. 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.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Çimlenme Yüzdesi, Ağırlık Kazanımı ve Kök Ucu Uzunluğu

$K_2Cr_2O_7$ 'nin tohum çimlenmesi üzerine etkisi Çizelge 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 1 ve Çizelge 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.

Çizelge 1. *Allium cepa*'da tohum çimlenmesi üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Table 1. Effect of $K_2Cr_2O_7$ on seed germination in *Allium cepa*

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

*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 $K_2Cr_2O_7$.

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

Table 2. Effect of $K_2Cr_2O_7$ on root length (cm) in *Allium cepa*

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

*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-Way" ANOVA varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Çizelge 3. *Allium cepa*'da tohum ağırlığı (g) üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Table 3. Effect of $K_2Cr_2O_7$ on seed weight (g) in *Allium cepa*

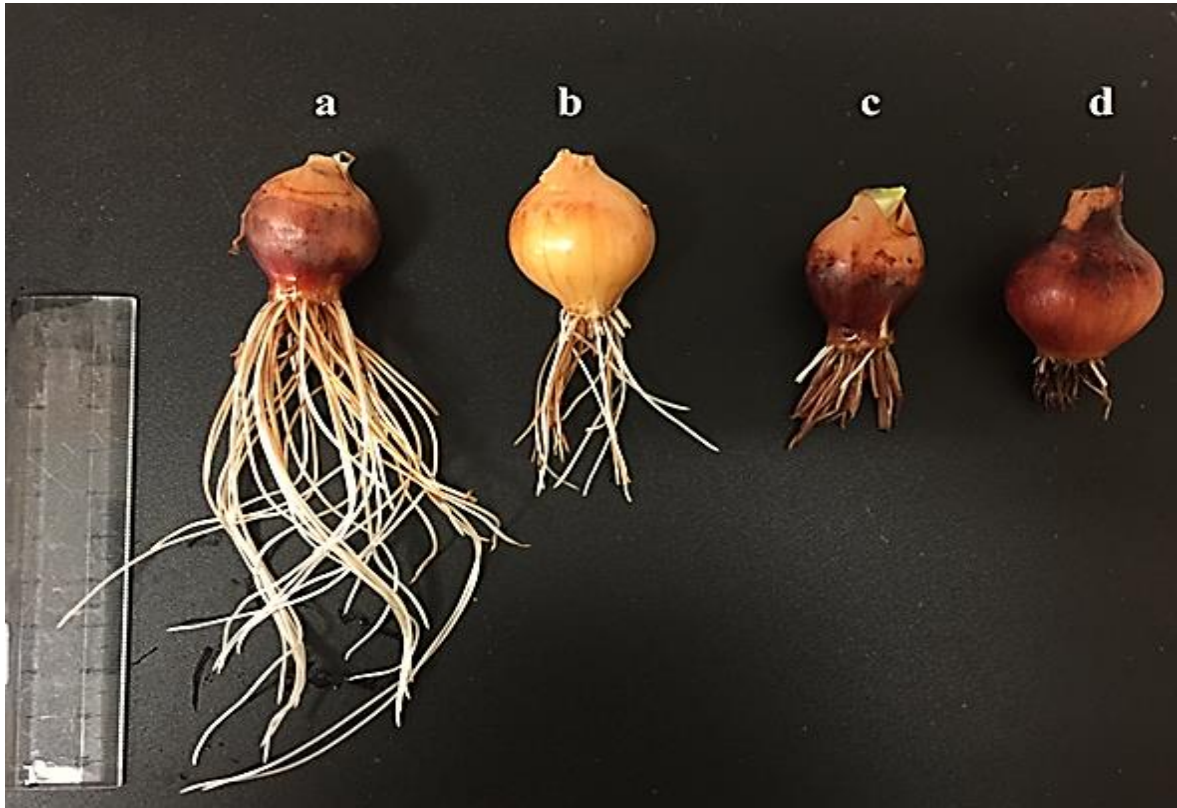
Gruplar	Başlangıç	Son	Ağırlık Artışı
Grup I	8.81±1.37 ^d	17.30±1.61 ^a	+8,49
Grup II	8.88±1.34 ^d	14.50±2.43 ^b	+5,62
Grup III	8.99±0.58 ^d	12.04±2.33 ^c	+3,05
Grup IV	8.92±0.97 ^d	9.93±1.87 ^d	+1,01

*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-Way" 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 Çizelge 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.

3.2. Kromozomal Anormallik, Mikronukleus ve Mitotik İndeks

$K_2Cr_2O_7$ 'nin kök ucu hücrelerinde teşvik ettiği MN oluşumu Şekil 2 ve Çizelge 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.



Şekil 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 $K_2Cr_2O_7$)

Figure 1. Effect of $K_2Cr_2O_7$ on root length (a: Group I: Control, b: Group II: 2.4 mg/L $K_2Cr_2O_7$, c: Group III: 8.0 mg/L $K_2Cr_2O_7$, d: Group IV: 12.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$)

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 Çizelge 5.'de gösterilmiştir. Mikroskobik 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.

Çizelge 4. *Allium cepa*'da $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği MN sıklığı

Table 4. MN frequency induced by $K_2Cr_2O_7$ in *Allium cepa*

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

*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).

Ortalamlar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “One-ay” ANOVA varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı sütün içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 5. *Allium cepa*'da MI değeri üzerine $K_2Cr_2O_7$ 'nin etkisi

Table 5. *Effect of $K_2Cr_2O_7$ on MI value in *Allium cepa**

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.

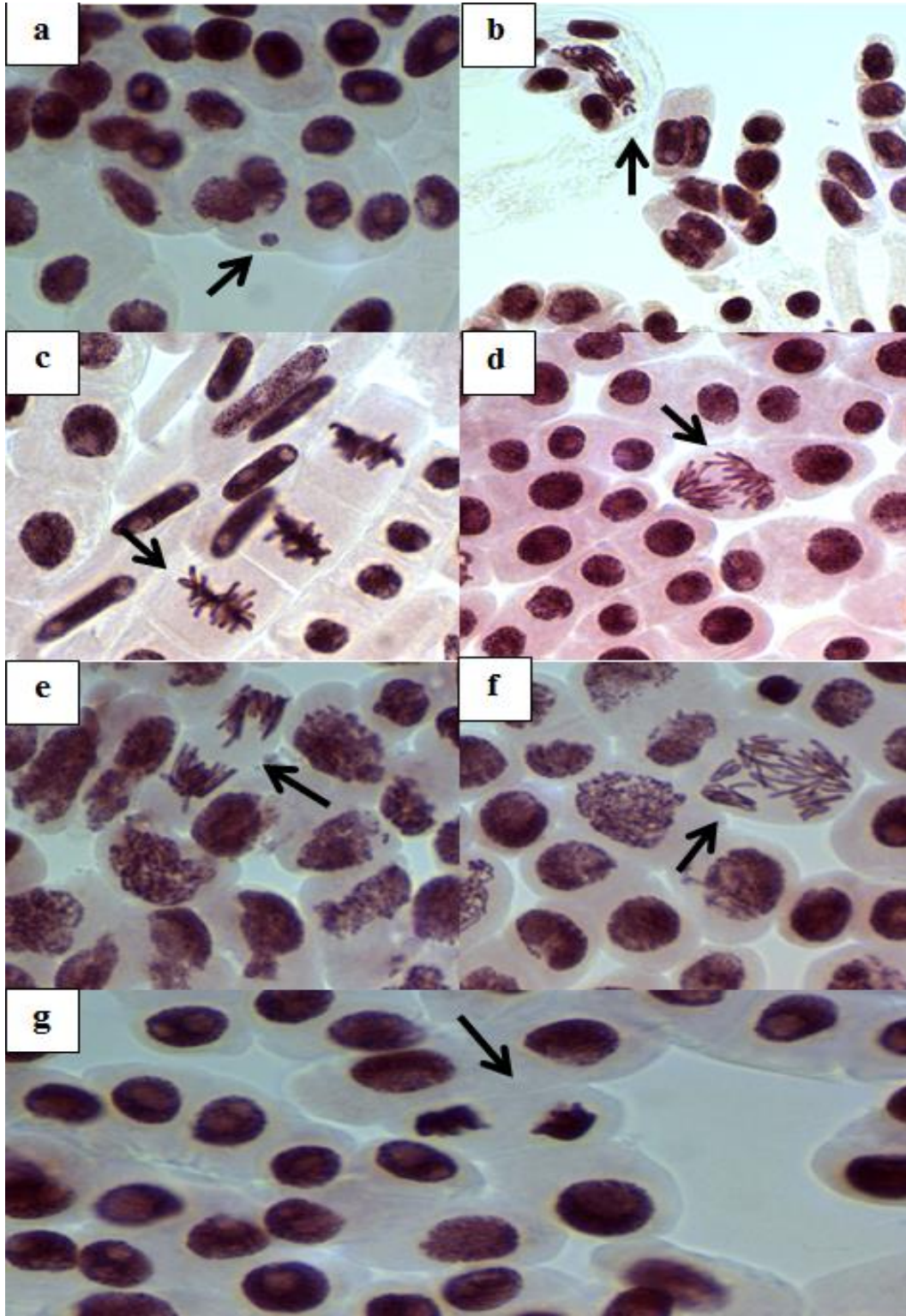
A. cepa kök ucu hücrelerinde $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar Şekil 2 ve Çizelge 6'da gösterilmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda, Kontrol Grubu tohumların kök ucu hücrelerinde birkaç yapışkan kromozom ve köprü dışında her hangi bir hasar gözlenmemiştir. Kontrol grubunda 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.

Çizelge 6. *Allium cepa*'da $K_2Cr_2O_7$ 'nin teşvik ettiği kromozomal hasarlar

Table 6. *Chromosomal damage induced by $K_2Cr_2O_7$ in *Allium cepa**

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 $K_2Cr_2O_7$. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir (n=10). Kromozomal hasarlar için, her bir gruptaki her bir kök ucundan 100 hücre, toplamda ise 1.000 hücre analiz edilmiştir. 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).

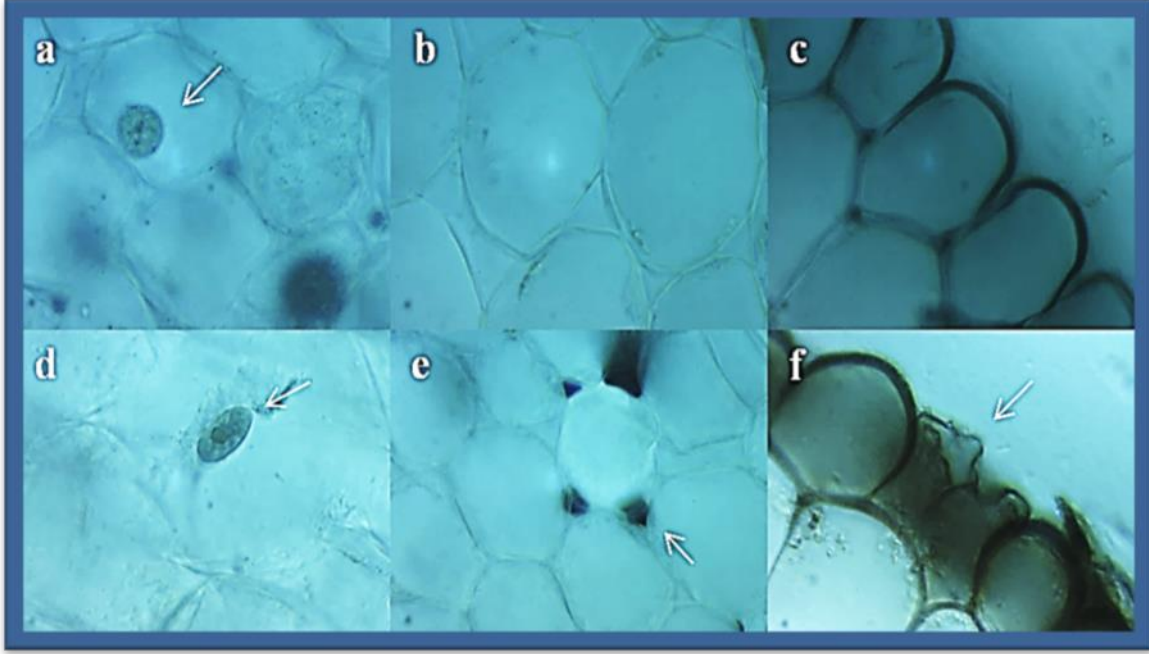


Şekil 2. $K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar (a: MN, b: fragment, c: yapışkan kromozom, d: köprü, e: kromatinin eşit olmayan dağılımı, f: C-mitoz, g: ters kutuplaşma)

Figure 2. Chromosomal damage induced by $K_2Cr_2O_7$ (a: MN, b: fragment, c: sticky chromosome, d: bridge, e: unequal distribution of chromatin, f: C-mitosis, g: reverse polarization)

3.3. Anatomik Hasarlar

$K_2Cr_2O_7$ tarafından teşvik edilen anatomik hasarlar Şekil 3’de gösterilmiştir. Kontrol Grubu tohumların kök ucu meristematik hücrelerinde her hangi bir hasar gözlenmezken, Cr uygulanan gruplardaki tohumların kök ucu hücrelerinde ise *yassılaştırmış hücre çekirdeği*, *korteks hücre çeperinde kalınlaşma*, *hücre deformasyonu* ve *nekroz* şeklinde anatomik hasarlar gözlenmiştir.



Şekil 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)

Figure 3. Anatomical damage induced by $K_2Cr_2O_7$ (a: normal appearance of cell nucleus, b: normal appearance of cortex cells, c: usual appearance of epidermis cells, d: flattened cell nucleus, e: thickening of the cortex cell wall, f: epidermis cell deformation and necrosis)

Krom (Cr); 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. Örneğin Panda ve ark. (2002) Cr uygulanan *Vigna radiata* (L.) Wilczek 'da çimlenme oranının azaldığını rapor etmişler, bu azalmayı ise Cr'nin bitkilerde amilaz enzimlerinin aktivitesini inhibe ederek ya da azaltarak embriyo gelişimi için gerekli olan glikoz kullanımını sınırlaması ve tohum çimlenmesini azaltması olarak açıklamışlardır. Peralta ve ark. (2001) ise çimlenme olayının bir tohumun gelişimindeki ilk süreç olması nedeniyle, bitkilerin Cr tolerans çalışmalarında bir indikatör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Tohumlarda ağırlık artışı incelenen diğer bir fizyolojik parametredir 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 $K_2Cr_2O_7$ 'nin en yüksek dozunda (12.5 mg/L) gözlenmiştir. Gupta ve ark. (2009) 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. (2001) *Portulaca oleracea* L. bitkisinde Cr (VI) birikiminin kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. 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 azaltabilmektedir (Dixit ve ark. 2002; Subrahmanyam, 2008).

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. (2005) Cr'nin ağır metaller arasında kök uzunluğu üzerinde yüksek toksik etkiye sebep olduğunu vurgulamıştır. Pandey ve ark. (2009) bezelye bitkilerinde 200 μ M Cr(VI) uygulamasının kök uzunluğunda %18 azalmaya neden olduğunu rapor etmiştir. Rout ve ark. (1997) ise 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 (Shanker ve ark. 2005). 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 (Mcgrath, 1995; Castro ve ark. 2007).

$K_2Cr_2O_7$ '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, özellikle 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 ark. (2012) *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 ark. (2014) trivalent ve heksavalent 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 (Arakawa ve ark. 2006; O'Brien ve ark. 2005; Xu ve ark. 1994). Hücrelerde nukleusa ulaşan Cr, DNA-fosfat omurgası ile elektrostatik

etkileşime girmekte, fosfat grupları ile kovalent bağ oluşturmakta, kırılmalara ve DNA degradasyonuna neden olmaktadır (Zhitkovich ve ark. 2000; Vijayalakshmi ve ark. 2002). 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 (Vajpayee ve ark. 2001). 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 iplikçığı bozuklukları ve kromozom kırıklarından köken alan MN oluşumları, sitotoksitenin önemli bir indikatörüdür (Von Ledebur ve Schmid, 1973; Högstedt ve Karlsson, 1985). $K_2Cr_2O_7$ '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 ark. (2012), *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 toksitenin 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 toksitenin varlığına işaret etmektedir (Fenech ve Crott, 2002; Fenech, 2010; Thomas ve ark. 2009; Wu ve ark. 2009; Fenech, 2000). 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 ark. (2012) 4.0 mg/L Cr uygulamasının *A. cepa*'da MI'yi %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 (Shanker ve ark. 2005).

$K_2Cr_2O_7$ 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 ilişkilirken, bazı anatomik değişimler ise toksisiteden ileri gelmektedir. Bitkiler metallerin toksik etkisini tolere edebilmek için dokularda biriktirme, detoksifikasyon sistemini aktive etme, atılımını arttırma, diğer dokulara geçişi azaltmak için korteks hücrelerinin kalınlaşması, hücre duvarında suberin akümüasyonu gibi bazı mekanizmalar geliştirmiştir (Paschke ve ark. 2005; Baker, 1981). 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.

4. Sonuç

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 diğer ökaryotik testlerle uyumlu olduğu düşünüldüğünde bu toksik etkilerin tüm ökaryotik canlılarda oluşabileceği muhtemeldir. Bu nedenle, söz konusu maddelerin bilinçli kullanımı, kontaminasyonu minimuma indirmek ve toksik etkileri azaltabilmek için gerekli önlemlerin alınması, sağlık açısından tavsiye edilmektedir.

Kaynaklar

- Arakawa, H., Wu, F., Costa, M., Rom, W., Tang, M., 2006. Sequence Specificity of Cr (III)-DNA Adduct Formation in the p53 gene: NGG Sequences are Preferential Adduct-Forming Sites. *Carcinogenesis*. 27, 639-645.
- Atik, M., Karagüzel, O., Ersoy, S., 2007. Sıcaklığın *Dalbergia sissoo* Tohumlarının Çimlenme Özelliklerine Etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 20(2), 203-210.
- Baldwin, D.R., Marshall, W.J., 1999. Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*. 36, 267-300.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and Excluders-Strategies in the Response of Plants To Heavy Metals. *Journal of Plant Nutrition*. 3, 643-654.
- Castro, R.O., Martínez-Trujillo, M., López Bucio, J., Cervantes, C.E., 2007. Effects of Dichromate on Growth and Root System Architecture of *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Science*. 172, 684-691.
- Cervantes, C., Garcia, J.C., Devars, S., Corona, F.G., 2001. Interactions of Chromium with Micro-Organisms and Plants. *FEMS Microbiology Review*. 25, 335-347.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2002. Chromium Ions Inactivate Electron Transport and Enhance Superoxide Generation in vivo in Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) Root Mitochondria. *Plant Cell Environment*. 25, 687-690.
- Duffus, J.H., Worth, H.G.J., 1996. *Fundamental Toxicology for Chemists* Royal Society of Chemistry, Cambridge, 327
- Fang, Z., Zhao, M., Zhen, H., Chen, L., Shi, P., Huan, Z., 2014. Genotoxicity of Tri- and Hexavalent Chromium Compounds *In Vivo* and Their Modes of Action on DNA Damage *In Vitro*. *PLoS ONE*. 9(8), e103194.
- Fenech, M., 2000. The in Micronucleus Technique. *Mutation Research*. 455, 81-95.
- Fenech, M., 2010. The Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay and its Application in Radiation Biodosimetry. *Health Physics*. 98(2), 234-243.
- Fenech, M., Chang, W.P., 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*. 534, 65.
- Fenech, M., Crott, W.J., 2002. 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.
- Gupta, S., Srivastava, S., Saradhi, P.P., 2009. Chromium Increases Photosystem 2 Activity in *Brassica juncea*. *Biol. Plant*. 53, 100-104.
- Gupta, K., Gaumat, S., Mishra, K., 2012. Studies on Phyto-Genotoxic Assessment of Tannery Effluent and Chromium on *Allium cepa*. *Journal of Environmental Biology*. 33, 557-563.
- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., Çobanoğlu, D., 2004. Ağır Metal İyonlarının (Cu+2, Pb+2, Hg+2, Cd+2) *Clivia sp.* Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*. 16(2), 177-182.

- Han, F.X., Maruthi, Sridhar, B.B., Monts, D.L., Su, Y., 2004. Phytoavailability and Toxicity of Trivalent and Hexavalent Chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist*. 162, 489-499.
- Högstedt, B., Karlsson, A., 1985. The Size of Micronuclei in Human Lymphocytes Varies According to Inducing Agent Used. *Mutation Research*. 156, 229-32.
- Kafadar, F., Saygıdeğer, S., 2010. Gaziantep İlinde Organize Sanayi Bölgesi Atık Suları İle Sulanan Bazı Tarım Bitkilerinde Kurşun (Pb) Miktarlarının Belirlenmesi. *Ekoloji*. 19(75), 41-48.
- Kimbrough, D.ED., Cohen, Y., Winer, A.M., 1999. A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 29, 1-46.
- Makbul, S., Kandemir, A., Turkmen, Z., Beyazoglu, O., 2008. Morphological and Anatomical Features of *Verbascum alyssifolium*. *Herbal Journal System Botanic*. 15, 125-140.
- Mcgrath, S.P., 1995. Chromium and Nickel, 152-178, In: Alloway, B.J., (Ed) *Heavy Metal In Soils*, Second Ed. Chapman and Hall, Great Britain.
- O'Brien, T.J., Brooks, B.R., Patierno, S.R., 2005. Nucleotide Excision Repair Functions in the Removal of Chromium-Induced DNA Damage in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 279, 85-95.
- Panda, S.K., Mahapatra, S., Patra, I.I.K., 2002. Chromium Toxicity and Water Stress Simulation Effects in Intact Senescing Leaves of Green Gram (*Vigna radiata* L. Var Wilckzeck K851), 129-136, In: Panda, S.K., (Ed), *Advances in Stress Physiology of Plants*, Scientific Publishers, India,
- Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R., 2009. Chromium Effect on ROS Generation and Detoxification in Pea (*Pisum sativum*) Leaf Chloroplasts. *Protoplasma*. 236, 85-95.
- Paschke, M.W., Valdecantos, A., Redente, E.F., 2005. Manganese Toxicity Thresholds for Restoration Grass Species. *Environmental Pollution*. 135, 313-322.
- Peralta, J.R., GardeaTorresday, J.L. . 2001. Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 66, 727-734.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 1977. Differential Chromium Tolerance Among Eight Mung Bean Cultivars Grown in Nutrient Culture. *Journal of Plant Nutrition*. 20, 341-347.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium Toxicity in Plants. *Environment International*. 31, 739-753.
- Staykova, T.A., Ivanova, E.N., Velcheva, I.G., 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.
- Subrahmanyam, D., 2008. Effects of Chromium Toxicity on Leaf Photosynthetic Characteristics and Oxidative Changes in Wheat (*Triticumaestivum* L.). *Photosynthetica*, 46, 339-345.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E K., Fenech, M., 2009. Buccal Micronucleus Cytome Assay. *Nature Protocol*. 4(6), 825-837.
- Wei, Q.X., 2004. Mutagenic Effects of Chromium Trioxide on RootTip Cells of *Vicia faba*. *Journal of Zhejiang University Science*. 5, 1570-1576.
- Wu, J., Lyons, G.H., Graham, R.D., Fenech, M., 2009. 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.
- Xu, J., Manning, F.C., Patierno, S.R., 1994. Preferential Formation And Repair of Chromium-Induced DNA Adducts and DNA-Protein Crosslinks in Nuclear Matrix DNA. *Carcinogenesis*. 15, 1443-1450.
- Vajpayee, P., Rai, U.N., Ali, M.B., Tripathi, R.D., Yadav, V., Sinha, S., Singh, S.N., 2001. Chromium Induced Physiological Changes in *Vallisneria spiralis* L. and Its Role in Phytoremediation of Tannery Effluent. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67, 246-256.
- Vijayalakshmi, R., Subramanian, V., Nair, B.U., Sarma, R.H., 2002. A Study of the Interaction of Cr (III) Complexes and Their Selective Binding with B-DNA: A Molecular Modeling Approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 19, 1063-1071.
- Volesky, B., 1990. Biosorption by Fungal Biomass. In *Biosorption of Heavy Metals*; Volesky, B., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 139-172.
- Von Ledeber, M.M., Schmid, W. , 1973. The Micronucleus Test: Methodological Aspects. *Mutation Research*. 19, 109-17.
- Zayed, A.M., Terry, N., 2003. Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation. *Plant Soil*. 249, 139-156.
- Zhitkovich, A., Shrager, S., Messer, J., 2000. 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. *Chemical Research in Toxicology*. 13, 1114-1124.
- Zurayk, R., Sukkariah, B., Baalbaki, R., 2001. Common Hydrophytes as Bioindicators of Nickel, Chromium and Cadmium Pollution. *Water Air Soil Poll.* 127, 373-388.