

Genotoksičan učinak talijeva(I) acetata na meristemske stanice boba (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.)

Melnjak, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:107754>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anamarija Melnjak

GENOTOKSIČAN UČINAK TALIJEVA(I) ACETATA NA MERISTEMSKE
STANICE BOBA (*Vicia faba* L.) I LUKA (*Allium cepa* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Mirjane Pavlica.

Najsrdačnije zahvaljujem prof. dr. sc. Mirjani Pavlica na strpljenju, pomoći i korisnim savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem dipl. inž. Petri Cvjetko na pomoći, podršci te velikom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem i svima onima koji su na bilo koji način svojim primjedbama i prijedlozima pomogli ostvarenju ovog rada.

Veliko hvala na podršci i razumijevanju mojoj obitelji i prijateljima.

Anamarija

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

GENOTOKSIČAN UČINAK TALIJEVA(I) ACETATA NA MERISTEMSKE STANICE BOBA (*Vicia faba* L.) I LUKA (*Allium cepa* L.)

Anamarija Melnjak

Zavod za molekularnu biologiju
Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Horvatovac 102a

SAŽETAK

U ovom radu je istraženo djelovanje talijeva(I) acetata na meristemske stanice luka i boba. Analizirana je mitotska aktivnost te vrsta i učestalost kromosomskih i mitotskih aberacija nakon 24 i 72 sata tretmana, kao i nakon 72 sata oporavka.

Rezultati su pokazali da talijev(I) acetat inhibira rast i mitotsku aktivnost u meristemskim stanicama obiju vrsta. Neposredno nakon tretmana kao i perioda oporavka uočene su multipolarne anafaze, mostovi, zaostali kromosomi, slijepljeni kromosomi i formiranje mikronukleusa. Iako su u ovom istraživanju korištene dvije biljne vrste, običan luk *Allium cepa* pokazao se kao osjetljivija vrsta u procjeni genotoksičnosti talija u odnosu na bob.

(43 stranice, 23 slike, 3 tablice, 21 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Vicia faba* L. / *Allium cepa* L. / *Allium*-test /, talijev(I) acetat / genotoksičnost

Voditelj: Dr. sc. Mirjana Pavlica, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Mirjana Pavlica, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Dr. sc. Davor Kovačević, izv. prof.

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

GENOTOXIC EFFECT OF THALLIUM(I) ACETATE ON MERISTEMATIC CELLS OF BROAD BEAN (*Vicia faba* L.) AND ONION (*Allium cepa* L.)

Anamarija Melnjak

Department of Molecular Biology
Faculty of Science, University of Zagreb
Horvatovac 102a, Zagreb

ABSTRACT

In the present study the effects of thallium(I) acetate on the root meristem cells of *Allium cepa* and *Vicia faba* were examined. The analysis of mitotic activity as well as the type and frequency of chromosomal and mitotic aberrations were done after 24h and 72h treatment period, as well as after 72h recovery period.

The result showed that thallium inhibited the root growth as well as mitotic activity in the meristematic cells of both species. Thallium treatment induced multipolar anaphases, bridges, laggards, stickiness and micronucleus formation which were also observed after 72h recovery period. Although both test system were used for genotoxicity assessment, *Allium cepa* was shown to be more sensitive plant model organism than *Vicia faba*.

(43 pages, 23 figures, 3 tables, 21 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: *Vicia faba* L. / *Allium cepa* L. / *Allium*-test /, thallium(I) acetate / genotoxicity

Supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Mirjana Pavlica, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Prof.

Dr. Davor Kovačević, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 BIOTESTOVI.....	3
1.1.1 GENOTOKSIČNOST.....	3
1.1.2 BILJNI TESTOVI.....	3
1.1.2.1 Allium-test.....	4
1.2 KROMOSOMSKE ANOMALIJE.....	6
1.3 TALIJ.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1 BILJNI MATERIJAL.....	14
3.1.1 BOB (<i>Vicia faba</i> L.).....	14
3.1.2 OBIČNI LUK (<i>Allium cepa</i> L.).....	15
3.2 TALIJEV(I) ACETAT.....	16
3.3 METODE.....	16
3.3.1 ALLIUM-TEST.....	16
3.3.2 CITOGENETIČKA ANALIZA.....	19
3.3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1 UČINAK TALIJEVA(I) ACETATA NA RAST KORJENČICA BOBA (<i>Vicia faba</i> L.) I LUKA (<i>Allium cepa</i> L.).....	22
4.2 CITOGENETIČKA ANALIZA.....	23
4.2.1 ANALIZA MITOTSKE AKTIVNOSTI U MERISTEMSKIM STANICAMA BOBA I LUKA.....	24
4.2.2 ANALIZA KROMOSOMSKIH ABERACIJA U MERISTEMSKIM STANICAMA BOBA I LUKA.....	26
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	39
7. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Biljke su u svom prirodnom staništu često izložene stresnim uvjetima. Najčešći ekološki čimbenici koji uvjetuju stres su nedostatak ili suvišak vode, promjena temperature, povećanje saliniteta, nedostatak kisika, promjene pH vrijednosti tla te različiti teški metali.

Tehnološki napredak i sve veća industrijska proizvodnja glavni su uzrok antropogenog onečišćenja okoliša. Koncentracija mnogih teških metala poput kadmija (Cd), žive (Hg), olova (Pb) i talija (Tl) se u prirodi neprestano povećava.

Iako je talij veoma rijedak element u prirodi, te spada u elemente u tragovima, koncentracija tog metala u okolišu se u posljednjih godina povećala oko 10 puta (John Peter i Viraraghavan 2005). Procjenjuje se da čovjek godišnje mobilizira 2 do 5 tisuća tona talija, od čega na samu proizvodnju talija otpada oko 17 tona (Frattoni 2005). Najveći izvor onečišćenja su cementare i elektrane koje energiju dobivaju sagorijevanjem ugljena, te uporaba talija u visokotehnološkim procesima i proizvodnji supravodiča.

Kemijskim analizama može se odrediti prisutnost pojedinog onečišćivača u okolišu te njegova koncentracija. No u okolišu je obično prisutna veća količina onečišćivača te nam poznavanje koncentracije svakog od njih neće dati potpuni uvid u njihovo djelovanje na žive organizme. Putem bioloških analiza možemo saznati na koji način onečišćenje djeluje na živi svijet.

Analize kromosomskih aberacija se vrlo često primjenjuju u analizi toksičnog učinka različitih kemijskih spojeva na molekulu DNA zbog važnosti i uloge genetičkog materijala u homeostazi svakog organizma.

1.1 BIOTESTOVI

Biotestovi nam omogućuju praćenje i mjerenje reakcije živog organizma na određene poremećene uvjete okoliša te pomoću njih na relativno brz način dobivamo informacije o štetnom učinku nekih tvari na organizam. Testiranje se izvodi u laboratoriju u kontroliranim uvjetima, a kao test organizmi najčešće se koriste bakterije, biljke, životinje i stanične kulture *in vitro*.

1.1.1 GENOTOKSIČNOST

Toksičnost (grč. *toxicon* = otrov) označava bilo kakav štetan utjecaj na žive organizme ili okoliš. Citotoksičnost obuhvaća sve negativne promjene vezane uz rast, diferencijaciju ili smrt stanica (apoptoza, nekroza). Genotoksičnost se odnosi na promjenu na razini nasljedne tvari, a genotoksične tvari su one tvari koje oštećuju molekulu DNA i/ili kromosome. Oštećenja u molekuli DNA mogu biti: DNA lomovi ili adukti, oksidacija i dimerizacija baza, unakrsne DNA-DNA ili DNA-protein veze. Ponekad stanice mogu popraviti nastala oštećenja, ali u nekim slučajevima dolazi do ireverzibilnih promjena koje dovode do mutacija (genske mutacije i kromosomske anomalije).

1.1.2 BILJNI TESTOVI

Kao test organizmi za procjenu genotoksičnosti spojeva vrlo se često koriste biljke zbog jednostavnog rukovanja, visoke osjetljivosti pojedinih vrsta, niskih materijalnih troškova, mogućnosti praćenja više pokazatelja učinka (morfološki izgled, biokemijske i fiziološke promjene, kromosomska slika), mogućnosti praćenja učinka u različitim uvjetima

(pH vrijednost, osvjetljenje, temperatura) i detekcije mjerljive promjene u kratkom roku.

1.1.2.1 Allium-test

Levan i njegovi suradnici su 1949. godine prvi standardizirali metodu za citogenetičko proučavanje učinaka raznih kemijskih spojeva. Metoda je dobila ime Allium-test, budući da se kao modelni organizam koristi biljka *Allium cepa* L., obični luk (Slika 1). Ona je pogodna za istraživanje zbog toga što je jeftina, lako se uzgaja, te ima relativno mali broj kromosoma pogodnih za analizu kromosomskih aberacija ($2n=16$). Istraživana otopina se drži u posudama sa širim otvorom iznad kojeg se smjesti lukovica sa korjenčićima tako da su oni uronjeni u tu otopinu (Slika 2). Nakon tretmana vrškovi korjenčića se fiksiraju, oboje, maceriraju te se metodom gnječenja naprave preparati u kojima se analizira diobena aktivnost i učestalost kromosomskih i mitotskih promjena. Lukovice sa korjenčićima se također mogu nakon tretmana prebaciti na oporavak u vodu ili tekuću hranjivu podlogu.

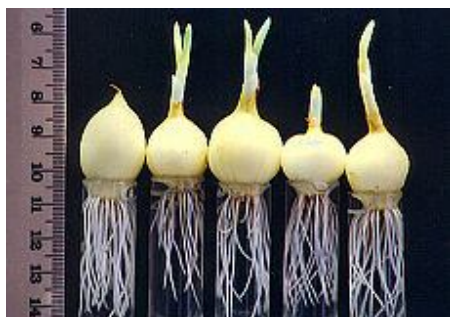


Slika 1. Lukovice običnog luka, *Allium cepa* L.

Test se može primijeniti i na biljnim vrstama iz rodova *Vicia*, *Tradescantia* i *Hordeum*. Prate se kromosomske promjene – mitotske nepravilnosti i kromosomske aberacije – te se na temelju njihovih učestalosti procjenjuje genotoksičnost spoja.

Obični luk, *Allium cepa*, poznat je kao izvrsni bioindikator genotoksičnog i mutagenog učinka kemikalija iz okoliša (Grant, 1994, 1999). Test na vrsti *Allium cepa* u kratkom vremenu pruža uvid u utjecaj onečišćivača okoliša na organizme (Fiskesjö, 1985, 1988; Cotellet i sur., 1999). Vrsta *Allium cepa* je zbog malog broja kromosoma te njihove veličine i poznate morfologije pogodna za otkrivanje kromosomskih aberacija a time i za otkrivanje mehanizma djelovanja ispitivanih kemijskih spojeva (Fiskesjö, 1985; Rank i Nielsen, 1997).

Allium-test pokazuje visoku podudarnost i sa ostalim testovima. To je važna karakteristika za precizno procjenjivanje utjecaja okolišnih čimbenika i uspješnog ekstrapoliranja rezultata testa dobivenih na ispitivanim vrstama na ostale vrste koje nisu obuhvaćene istraživanjem. Fiskesjö (1985) je pokazala da je *Allium*-test jednako osjetljiv kao testovi na algama i ljudskim limfocitima. Rezultati brojnih istraživanja su također pokazali da je vrsta *Allium cepa* L. osjetljivija od nekih drugih biljnih vrsta, primjerice od vrste *Vicia faba* L. (Ma i sur., 1995; Miglid i sur., 2007).



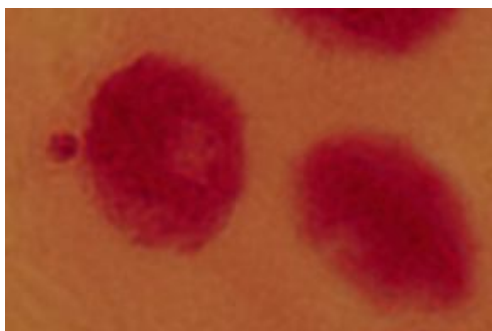
Slika 2. Naklijavanje lukovica običnog luka.

1.2 KROMOSOMSKE ANOMALIJE

Kromosomske anomalije su promjene u strukturi kromosoma (kromosomske aberacije) ili promjene u ukupnom broju kromosoma. Do tih promjena može doći spontano, ali i kao posljedica izlaganja nekom fizikalnom ili kemijskom agensu (Russel, 2002). Oni mogu inducirati kromosomske anomalije kroz različite mehanizme koji uključuju klastogene i aneugene učinke. Klastogeni učinci su karakterizirani lomom kromosoma tijekom diobe stanice, a aneugeni učinci uključuju inaktivaciju staničnih struktura poput diobenog vretena koje mogu dovesti do gubitka kromosoma (Fenech, 2000).

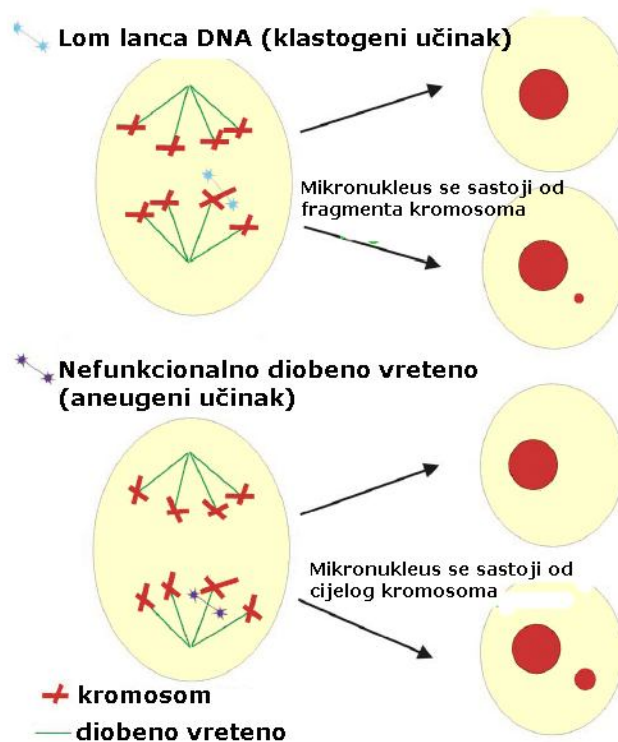
U kromosomske aberacije ubrajamo i različite promjene poput abnormalnosti jezgara kao što su: mikronukleus (MN), pupanje jezgre, reznjaste jezgre i višejezgrene stanice.

Mikronukleus (Slika 3) je malo, okruglo kromatinsko tjelešce koje se nalazi uz jezgru unutar iste citoplazme. Bojom i konzistencijom se ne razlikuje od jezgre ali je smješten u istoj optičkoj ravnini. Mikronukleus nikad nije povezan citoplazmatskim mostićem s jezgrom i manji je od $\frac{1}{3}$ promjera jezgre.



Slika 3. Mikronukleus u interfaznoj jezgri vrste *Allium cepa* L.

Mikronukleus nastaje (Slika 4) kada se zbog nefunkcionalnog diobenog vretena acentrični fragmenti nastali kao posljedica loma kromosoma (klastogeni učinak) ili cijeli kromosomi (aneugeni učinak) ne ugrađuju u jezgru, već tijekom staničnog ciklusa zaostaju u citoplazmi i formiraju malu jezgru, odnosno mikronukleus (Fenech, 2000). Dioba stanice je nužan preduvjet za nastanak mikronukleusa. Prema Fernandesu i sur. (2007) pupanje jezgara predstavlja početni stadij oslobađanja jezgrinog materijala, koji je posljedica amplifikacije gena (Fenech 2003).



Slika 4. Nastanak mikronukleusa: klastogeni i aneugeni učinak.

Grant (1982) svrstava kromosomske aberacije u sljedeće kategorije:

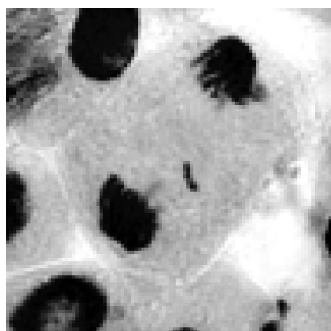
- C-mitoza – kolhicinski učinak – posljedica inaktivacije diobenog vretena što rezultira raštrkavanjem kromosoma u stanici
- tripolarne i tetrapolarne anafaze (Slika 5)



Slika 5. Tetrapolarna anafaza u meristemskim stanicama običnog luka.

- dvojezgrene, višejezgrene i poliploidne stanice
- ljepljivost kromosoma i stvaranje gruda kromosoma („stickiness”) – posljedica nepravilnog slaganja kromosomskih niti u kromatide pri čemu dolazi do miješanja niti pa se kromosomi pričvršćuju jedan uz drugog subkromatidnim mostovima
- kromosomske maglice – posljedica despiralizacije kromosoma
- otapanje kromosoma – posljedica potpunog rušenja strukture kromosoma
- erozija kromosoma – posljedica kromosomske despiralizacije i djelomičnih lomova kromonema struktura
- fragmentacija kromosoma - posljedica višestrukih lomova kromosoma
- kromosomska tjelešca – jako kondenzirani mikronukleus u interfazi koji je rezultat višestrukih kromosomskih lomova ili erozije kromatina

- kromosomski lom – uzrok nastajanja fragmenata (Slika 6) i anafaznih mostova te izmjenjena kromosomskih segmenata



Slika 6. Fragment kromosoma u telofazi.

- međukromatidne veze

1.3 TALIJ

Talij (Slika 7) pripada skupini teških metala budući da njegova gustoća iznosi $11,83 \text{ g/cm}^3$ (Emsley, 2001). To je srebrno-bijeli metal, izrazito mekan pa se može rezati nožem. Nalazi se u 6. periodi i 13. grupi periodnog sustava elemenata. Atomski broj je 81, a relativna atomska masa 204,38. Talište mu je pri $304 \text{ }^\circ\text{C}$, a vrelište $1473 \text{ }^\circ\text{C}$. Reagira sa vodenom parom iz zraka i pri tome nastaje talijev hidroksid, TlOH . Na zraku oksidira pa se čuva u petroleju. Reagira s kiselinama. Postoji u 2 oksidacijska stanja, Tl(I) i Tl(III) . U prirodi postoje 2 izotopa talija - talij-203 kojeg ima oko 30% i talij-205 kojeg ima oko 70%.



Slika 7. Talij.

Talij je otkriven 1861. godine kad je William Crookes otkrio zelenu liniju u atomskom spektru nečiste sumporne kiseline. Budući da ga je zelena boja spektra podsjećala na zelene pupoljke (grč. *thallos* = propupala grančica), novootkriveni element je nazvao talij.

U prirodi je talij rasprostranjen u vrlo malim količinama, najčešće kao sastavni dio sulfidnih ruda drugih metala. Među najpoznatije minerale ubrajamo kruksit (Cu_7TlSe_4) i lorandit (TlAsS_2).

Iako je uporaba talija u razvijenim zapadnim zemljama zabranjena, u mnogim zemljama u razvoju još se uvijek koristi kao pesticid, insekticid i rodenticid.

Iako talij nema nikakve biološke važnosti, čovjek dnevno unese oko 2 μg talija putem hrane. Talij se u tijelu najviše nakuplja u bubrezima i jetri. Talijev(I) ion je po veličini i naboju sličan kalijevom (Tl^+ , K^+) pa oponaša kalij u metaboličkim putevima nekih enzima u mozgu, mišićima te koži koji se inače aktiviraju kalijem. To dovodi do karakterističnih simptoma trovanja talijem – letargija, ukočenost, trnci u rukama i nogama, zamagljenje vida, nerazgovijetan govor, opća slabost i gubitak kose i dlaka (Emsley, 2001).

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

Talij je u prirodi vrlo rijedak element, ali se njegova koncentracija u okolišu neprestano povećava kao posljedica antropogenog djelovanja. Trovalentni talij (Tl^{3+}) je izuzetno toksičan, ali stvara stabilne komplekse pa nije toliko biodostupan kao jednovalentni talij (Tl^{+}).

Do sada nije značajno proučavan njegov toksičan učinak na biljne organizme, stoga mehanizam toksičnosti talija još uvijek nije poznat.

Cilj ovog istraživanja je bio procjena genotoksičnog učinka talija na meristemske stanice korijena boba (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.). U tu svrhu mjerenjem duljine korjenčića željela sam ispitati učinak različitih koncentracija talijeva(I) acetata na rast. Analizom mitotske aktivnosti te određivanjem vrste i učestalosti kromosomskih i mitotskih aberacija nastojala sam utvrditi učinak talijeva(I) acetata na staničnoj razini.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 BILJNI MATERIJAL

U ovom radu sam za utvrđivanje genotoksičnog djelovanja talijeva(I) acetata kao test organizam koristila dvije biljne vrste: bob (*Vicia faba* L.) i luk (*Allium cepa* L.).

3.1.1 BOB (*Vicia faba* L.)

Bob, *Vicia faba* L., je dvosupnica iz roda *Vicia*, grahorice, koji pripada porodici Fabaceae, mahunarke ili lepirnjače (Slika 8). Potječe iz sjeverne Afrike i jugozapadne Azije, ali je kultiviran svugdje u svijetu. Postoji više varijeteta, npr. bob, *Vicia faba* var. major i konjski bob, *V. faba* var. equina. U ovom istraživanju sam koristila varijetet *V. faba* var. aquadulce.



Slika 8. Bob, *Vicia faba* L.

Bob ima uspravnu četverobridnu stabljiku visine 0,5-1,7 m. Listovi su parno perasti bez vitica, a liske eliptične. Os lista (rachis) završava kratkim šiljkom. Vjenčić je bijel, a cvjetovi dolaze u pazušcima listova. Plod je mahuna koja je kod divljih vrsta duga 5-10 cm, dok je kod kultivara koji se koriste za hranu duga 15-25 cm, a debela čak 2-3 cm. U mahuni dolazi 3 do 8 sjemenka koje su spljoštene. U jezgri se nalazi 14 kromosoma, od kojih je 6 parova akrocentričnih, a jedan metacentričan.

Bob se od davnina u Starom svijetu koristi kao hrana jer se vrlo lako uzgaja. Podnosi niske temperature stoga može prezimiti. To je vrlo korisna biljka koja zbog razvijenog korijenovog sustava sprečava eroziju tla, a istovremeno obogaćuje tlo dušikovim spojevima, uostalom kao i druge biljne vrste pripadnice porodice mahunarki.

3.1.2 OBIČNI LUK (*Allium cepa* L.)

Obični luk, *Allium cepa* L., je višegodišnja jednosupnica iz porodice Liliaceae, ljiljani (Slika 9). U jezgri somatskih stanica se nalazi 16 kromosoma, od čega je 1 par akrocentričan, a ostali su submetacentrični. Stanice su relativno velike, stoga je luk pogodan materijal za citogenetička istraživanja kao i demonstraciju mikroskopiranja u nastavnim aktivnostima.



Slika 9. Luk, *Allium cepa* L.

Lukovica je duguljasta i obično dolaze 3-4 zajedno u ovojnom listu. Listovi su šuplji valjkasti, cvat je okrugao, a cvjetovi bijeli. Spata je dvolisna, kožasta i kraća od cvata. Razmnožava se pomoću sjemenki ili, još češće, vegetativno pomoću lukovica.

3.2 TALIJEV(I) ACETAT

Talijev(I) acetat, CH_3COOTl , je otrovan bijeli kristal bez mirisa. Higroskopan je što znači da navlači vlagu iz zraka. Talište mu je pri 129 °C, a gustoća 3,68 g/cm³. Vodene otopine talijevog(I) acetata su bazične. Pohranjuje se pri temperaturi od 4 °C.

3.3 METODE

3.3.1 ALLIUM-TEST

Sjemenke boba stavila sam u čašu s destiliranom vodom te pustila da nabubre preko noći. Idući dan sam ogulila sjemenu lupinu, a sjemenke stavila na vlažan papir u velike Petrijeve posude. Sjemenke su uzgajane u komori na temperaturi od 21 °C (Slika 10). Nakon 2-3 dana, kada su primarni korijeni narasli do veličine od 2-3 cm, uklonila sam vršni dio korijena, kako bi potakla razvoj sekundarnih korjenčića. Tek kad su sekundarni korjenčići dosegli veličinu od oko 2 cm (Slika 11), biljke sam upotrijebila za pokus (Slika 12).

Budući da luk nema primarni korijen već čupavo korijenje, lukovice sam naklijavala 48 sati tako da je samo donji dio bio uronjen u vodu. Kad su korjenčići dosegli veličinu od 2 cm, upotrijebila sam ih za pokus.



Slika 10. Uzgajanje sjemenki boba u komori.



Slika 11. Sekundarni korjenčići boba dovoljno veliki za izvođenje pokusa.



Slika 12. Rast biljaka na ispitivanim otopinama.

U pokusima sam koristila vodenu otopinu talijeva(I) acetata koncentracije $4 \mu\text{M}$ i $40 \mu\text{M}$.

Kontrolne biljke su cijelo vrijeme pokusa uzgajane na destiliranoj vodi, dok sam korjenčiće tretiranih biljaka boba i luka izlagala različitim vremenskim kombinacijama prikazanim u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz eksperimentalnog izvođenja pokusa.

Biljna vrsta	Tretman	Oporavak
<i>Allium cepa</i>	24 h TI	72 h H ₂ O
	72 h TI	
<i>Vicia faba</i>	24 h TI	72 h H ₂ O
	72 h TI	

Uzorke korjenčića kontrolnih biljaka sam uzimala u istom vremenskom periodu kao i kod biljaka koje su rasle na talijevom(I) acetatu.

Nakon tretmana fiksirala sam po 2 korjenčića po svakoj biljci boba i luka koja je rasla na istraživanoj otopini, kao i na kontrolnim biljkama. Otopinu za fiksaciju priredila sam kao smjesu etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1. Fiksirani materijal sam pohranila u hladnjak. Svrha fiksacije je usmrtiti stanice, ali da pritom ne dođe do promjene u strukturi tkiva.

3.3.2 CITOGENETIČKA ANALIZA

Za analizu mitotske aktivnosti meristemskih stanica korijena boba i luka, odnosno proučavanja kromosomskih aberacija tijekom stanične diobe i interfaze, koristila sam standardnu Feulgen „squash“ tehniku (Sharma i Sharma, 1972.). Fiksirane korjenčiće sam prvo hidrolizirala u 1 M HCl na 60 °C. Korjenčiće boba sam hidrolizirala 6 min, a luka 3 min. Nakon ispiranja vodom korjenčići su bojani Feulgenovom otopinom 1-2 sata na tamnom mjestu. Prilikom hidrolize u 1 M HCl dolazi do odcjepljivanja purinskih baza (adenin i gvanin) u molekuli DNA od šećera pa se time oslobađa aldehidna skupina šećera. Aldehidna skupina reagira sa Schiffovim reagensom (fuksin + H_2SO_3) dajući crveno do ljubičasto obojen spoj pa dobro obojeni korjenčići imaju ljubičasti vršak. Nakon bojanja korjenčića izradila sam preparate. Obojeni vršni dio korijena sam odvojila žiletom od ostatka te ga stavila na predmetno staklo u kap 45%-tne octene kiseline. Tkivo sam zgnječila tupim krajem laboratorijske iglice te sam na tako macerirano tkivo stavila pokrovno stakalce i napravila snažan „squash“ (tehnika gnječenja palcem) kako bih dobila stanice u jednom sloju. Preparate sam zatim smrznula pomoću suhog ugljik(IV)

oksida te pustila da se suše 24 h na zraku. Preparate sam utrajnila uklapanjem u Euparal i sušenjem u termostatu na 60 °C nekoliko dana. Analizu preparata sam izvršila pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus) kod povećanja 1000x.

Analizirala sam mitotsku aktivnost meristemskih stanica korijena i izrazila je kao mitotski indeks. To je udio stanica u mitozu prema ukupnom broju stanica, a izražava se u postocima. Analizirala sam i vrstu i učestalost kromosomskih aberacija. U svakom uzorku sam pregledala 6000 stanica.

Mitotska aktivnost prikazuje se pomoću mitotskog indeksa (M.I.), a on se izražava kao broj stanica u diobi prema ukupnom broju ispitanih stanica.

$$\text{M.I.} = (\text{broj stanica u diobi}) / (\text{ukupan broj stanica}) \times 100 (\%)$$

3.3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

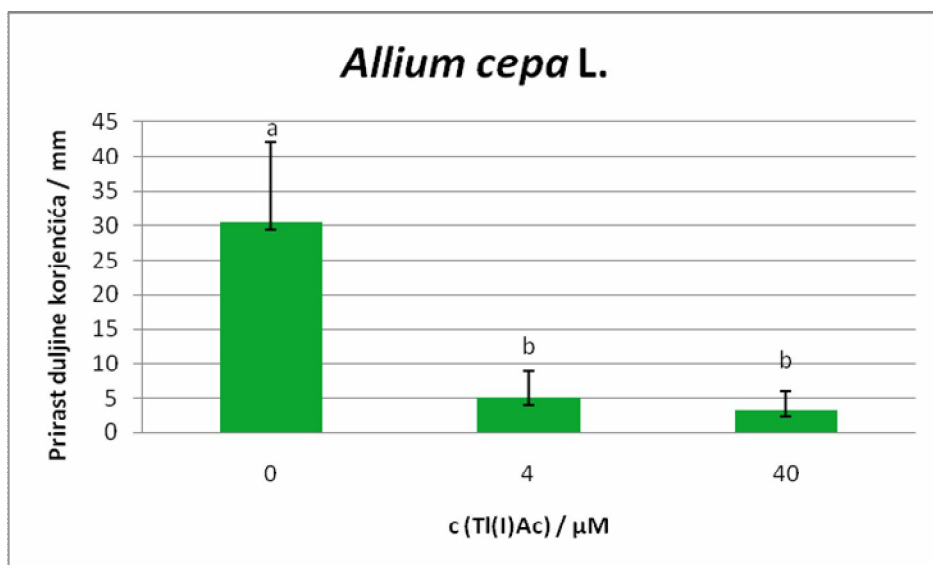
Statistička analiza podataka provedena je DNMRT testom (Duncan's New Multiple Range Test) pomoću računalnog programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc., SAD). Statistički značajni su rezultati koji se razlikuju na razini $p \leq 0,05$, a označeni su različitim slovima.

4. REZULTATI

4.1 UČINAK TALIJEVA(I) ACETATA NA RAST KORJENČIĆA BOBA (*Vicia faba* L.) I LUKA (*Allium cepa* L.)

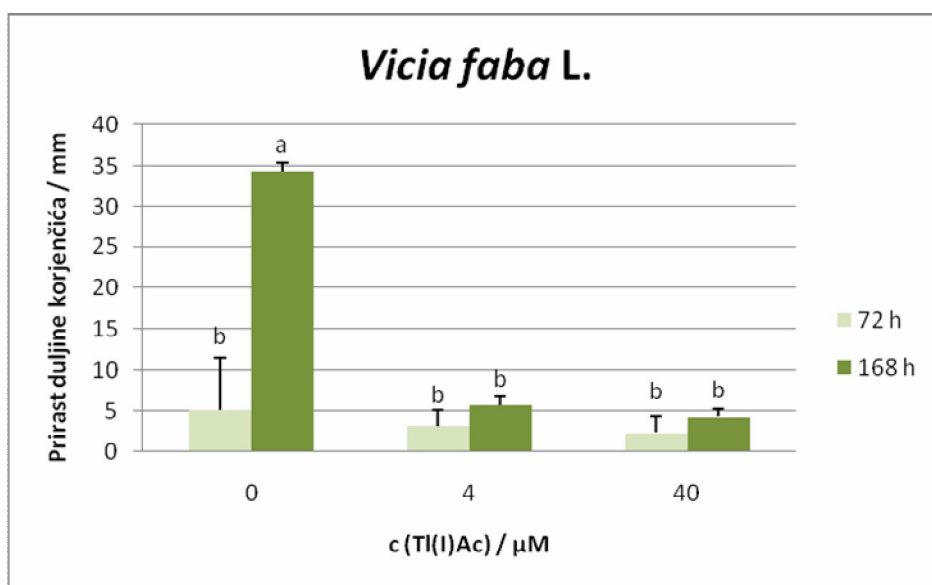
Bob (*Vicia faba* L.) i luk (*Allium cepa* L.) tretirani su otopinom talijeva(I) acetata koncentracije 4 μM i 40 μM tokom 72 sata. Korjenčićima boba i luka izmjerila sam duljinu prije tretmana te nakon 72 sata tretmana.

Rezultati mjerenja duljine prirasta korjenčića boba i luka pokazuju inhibiciju rasta korjenčića onih biljaka koje su rasle na otopinama talijeva(I) acetata (Slike 13 i 14). Duljina prirasta korjenčića smanjuje se povećanjem koncentracije talijeva(I) acetata.



Slika 13. Prosječni prirast duljine korjenčića luka nakon 72 sata tretmana na različitim koncentracijama otopine talijeva(I) acetata. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMR).

Talij nije pokazao statistički značajan inhibitorni učinak na rast korjenčića boba nakon 72 sata tretmana. Međutim, obzirom da je rast korjenčića kontrolnih biljaka također bio usporen tijekom 72 sata tretmana, izvršeno je mjerenje duljine korjenčića nakon tretmana u trajanju od 168 sati.



Slika 14. Prosječni prirast duljine korjenčića boba nakon tretmana od 72 i 168 sata ovisno o koncentraciji talijeva(I) acetata. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMRT).

4.2 CITOGENETIČKA ANALIZA

U ovom istraživanju pratila sam promjene mitotske aktivnosti meristemskih stanica korijena boba i luka.

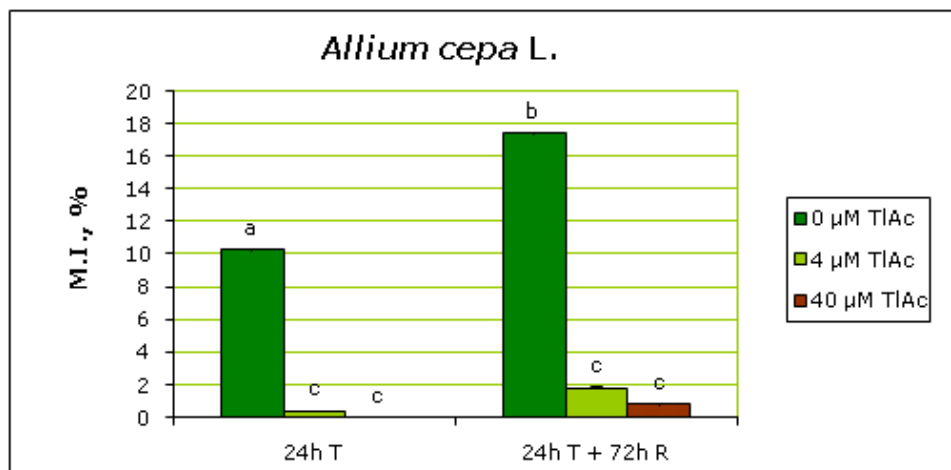
Osim mitotske aktivnosti pratila sam i promjene tijekom mitoze te u interfaznim jezgrama koje bi mogle biti posljedica djelovanja talijeva(I) acetata.

4.2.1 ANALIZA MITOTSKE AKTIVNOSTI U MERISTEMSKIM STANICAMA BOBA I LUKA

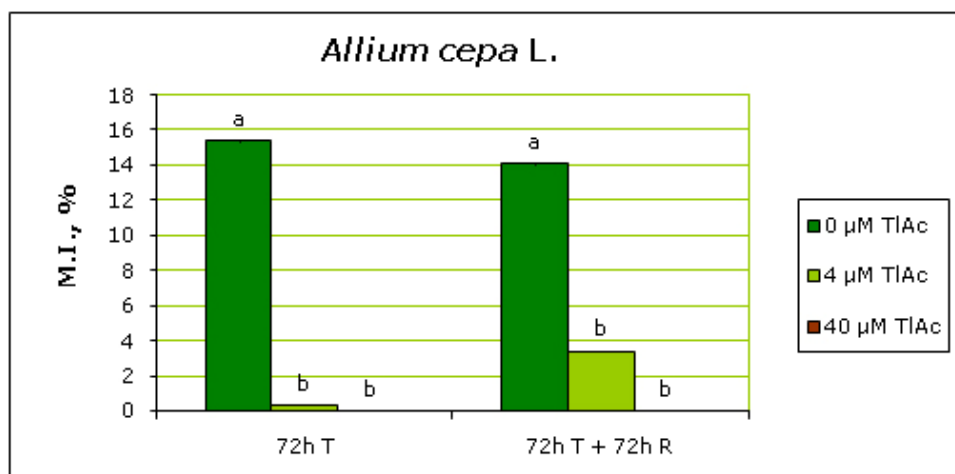
Na slikama 15, 16, 17 i 18 prikazani su rezultati analize mitotske aktivnosti u stanicama luka i boba nakon tretmana s talijevim(I) acetatom i oporavka u vodi:

- 24h tretman (0 μ M TIAC, 4 μ M TIAC, 40 μ M TIAC)
- 24h tretman (0 μ M TIAC, 4 μ M TIAC, 40 μ M TIAC) + 72h oporavak
- 72h tretman (0 μ M TIAC, 4 μ M TIAC, 40 μ M TIAC)
- 72h tretman (0 μ M TIAC, 4 μ M TIAC, 40 μ M TIAC) + 72h oporavak

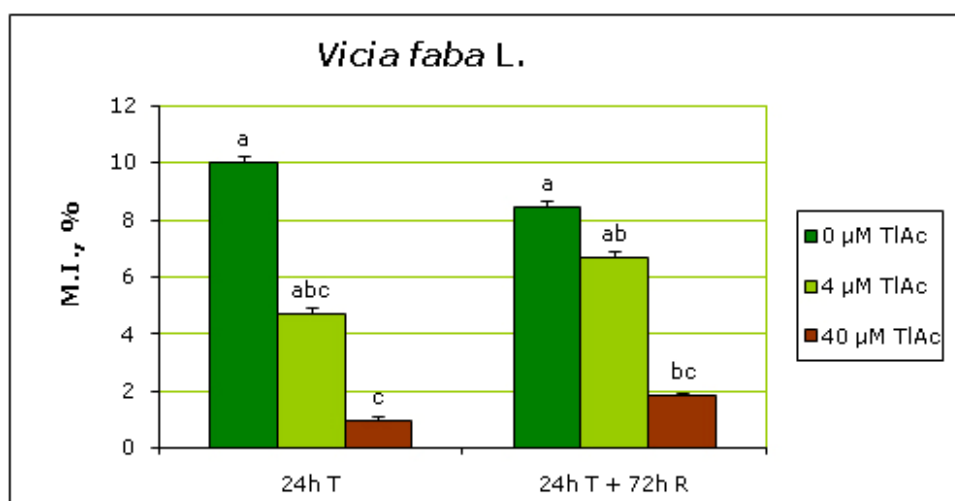
Inhibicija diobe stanica boba i luka povećava se s povećanjem koncentracija otopine talijeva(I) acetata. Mitotska aktivnost stanica nakon oporavka veća je od mitotske aktivnosti nakon tretmana, ali rezultati nisu statistički značajni.



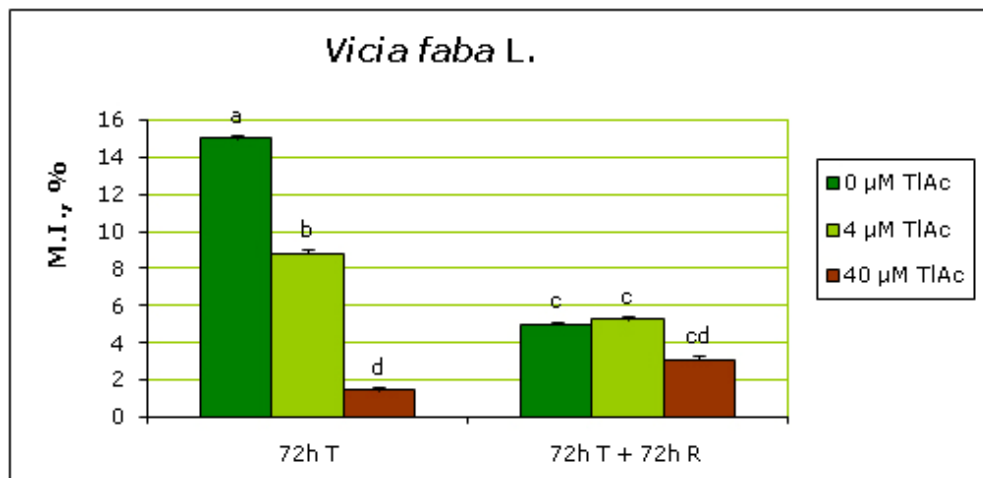
Slika 15. Mitotska aktivnost meristemskih stanica luka nakon 24h tretmana te 24h tretmana i 72h oporavka u vodi. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMRT).



Slika 16. Mitotska aktivnost meristemskih stanica luka nakon 72h tretmana te 72h tretmana i 72h oporavka u vodi. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMRT).



Slika 17. Mitotska aktivnost meristemskih stanica boba nakon 24h tretmana te 24h tretmana i 72h oporavka u vodi. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMRT).



Slika 18. Mitotska aktivnost meristemskih stanica boba nakon 72h tretmana te 72h tretmana i 72h oporavka u vodi. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; DNMRT).

4.2.2 ANALIZA KROMOSOMSKIH ABERACIJA U MERISTEMSKIM STANICAMA BOBA I LUKA

Talijev(I) acetat je na meristemske stanice luka djelovao inhibirajuće, odnosno doveo je do smanjenja mitotskog indeksa. Mitotska aktivnost stanica nakon oporavka u trajanju 72 sata nije značajnije porasla. Budući da je dioba stanica potrebna da bi aberacije postale vidljive nije bilo moguće identificirati veliki broj kromosomskih aberacija.

Aberacije koje su uočene u ovom istraživanju bili su mikronukleusi (Slika 19), C-mitoza, zaostali kromosomi, multipolarna anafaza, kromosomski fragmenti, anafazni (Slika 22) i telofazni mostovi (Slika 23) te sljepljivanje kromosoma (Slika 20 i 21).

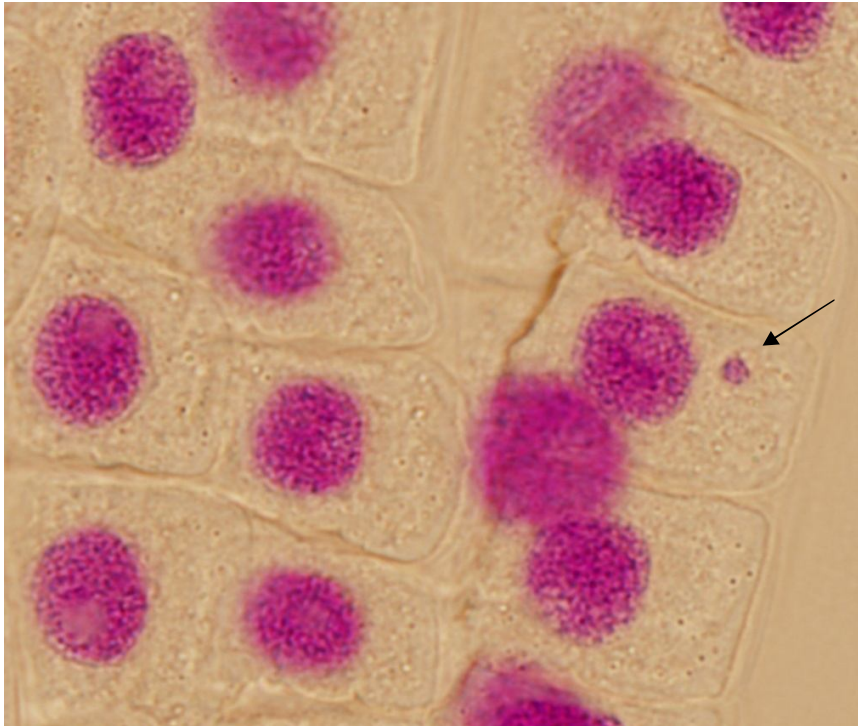
Vrste i broj aberacija u meristemskim stanicama običnog luka prikazane su u tablici 2, dok su vrste i broj aberacija u meristemskim stanicama boba prikazane u tablici 3.

Tablica 2. Broj i vrsta kromosomskih aberacija u meristemskim stanicama korijena običnog luka.

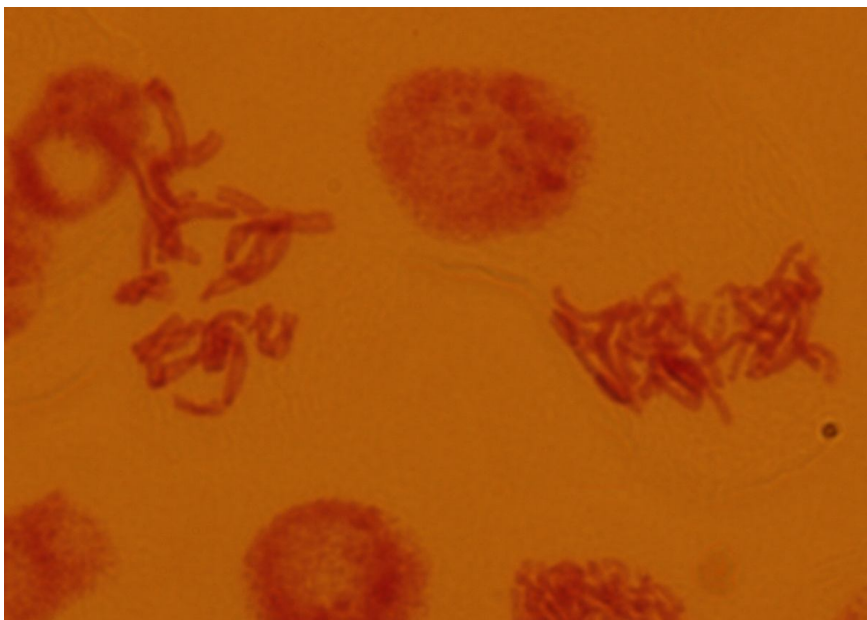
			poremećena funkcija diobenog vretena			promjena u strukturi kromosoma	promjena u strukturi kromatina			
uzorak	broj stanica u diobi	mikronukleus	C-mitoza	zaostali kromosomi	multipolarna anafaza	fragment	anafazni mostovi	telofazni mostovi	sljepljeni kromosomi	broj aberacija
<i>A. cepa</i> 24h T	0 μ M TIAC	616	1	-	1	2	-	-	-	4
	4 μ M TIAC	23	-	-	-	-	1	-	5	6
	40 μ M TIAC	1	3	-	-	-	-	-	1	4
<i>A. cepa</i> 24h T + 72h R	0 μ M TIAC	348	-	-	-	-	-	-	-	0
	4 μ M TIAC	108	5	-	-	1	-	-	5	11
	40 μ M TIAC	50	4	2	-	1	-	-	2	9
<i>A. cepa</i> 72h T	0 μ M TIAC	924	3	-	2	-	1	-	1	7
	4 μ M TIAC	18	9	-	-	4	1	-	3	17
	40 μ M TIAC	3	9	-	-	-	-	-	-	9
<i>A. cepa</i> 72h T + 72h R	0 μ M TIAC	846	1	4	1	4	-	1	2	13
	4 μ M TIAC	205	-	-	-	2	8	-	29	39
	40 μ M TIAC	0	13	-	-	-	-	-	-	13

Tablica 3. Broj i vrsta kromosomskih aberacija u meristemskim stanicama korijena boba.

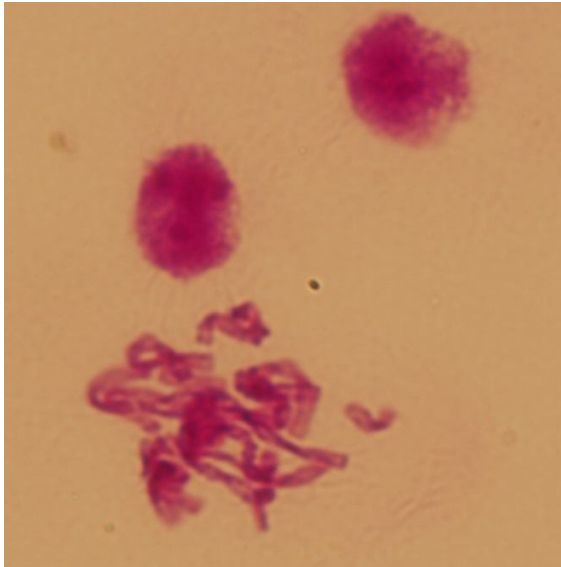
			poremećena funkcija diobenog vretena			promjena u strukturi kromosoma	promjena u strukturi kromatina				
uzorak		broj stanica u diobi	mikronukleus	C-mitoza	zaostali kromosomi	multipolarna anafaza	fragment	anafazni mostovi	telofazni mostovi	sljepljeni kromosomi	broj aberacija
V.faba 24h T	0 μM TIAC	601	2	1	-	3	-	1	-	1	8
	4 μM TIAC	284	4	-	-	-	1	-	-	6	11
	40 μM TIAC	58	1	-	-	-	-	-	-	-	1
V. faba 24h T + 72h R	0 μM TIAC	508	-	1	-	2	-	-	-	7	10
	4 μM TIAC	400	2	-	-	3	-	2	1	19	27
	40 μM TIAC	111	-	-	-	-	-	1	-	9	10
V. faba 72h T	0 μM TIAC	900	6	-	1	-	-	1	1	3	12
	4 μM TIAC	529	4	-	1	4	1	1	-	12	23
	40 μM TIAC	87	7	-	1	6	1	2	-	5	22
V. faba 72h T + 72h R	0 μM TIAC	299	1	-	-	-	-	2	-	1	4
	4 μM TIAC	317	-	-	-	4	-	-	-	10	14
	40 μM TIAC	187	4	-	-	2	-	-	-	3	9



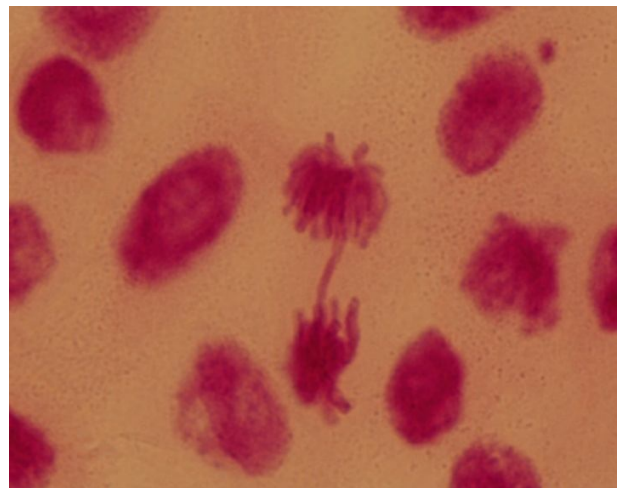
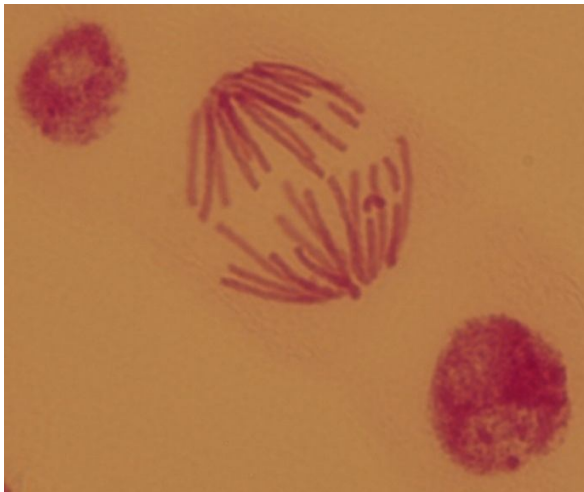
Slika 19. Mikronukleus uz interfaznu jezgru meristemske stanice luka (povećanje 1000x).



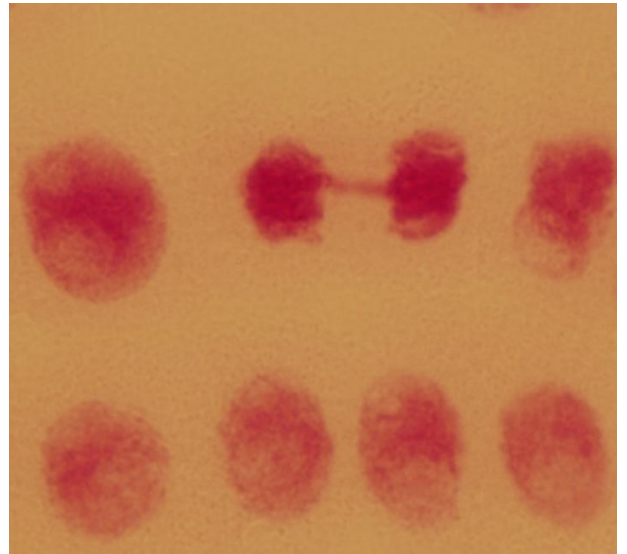
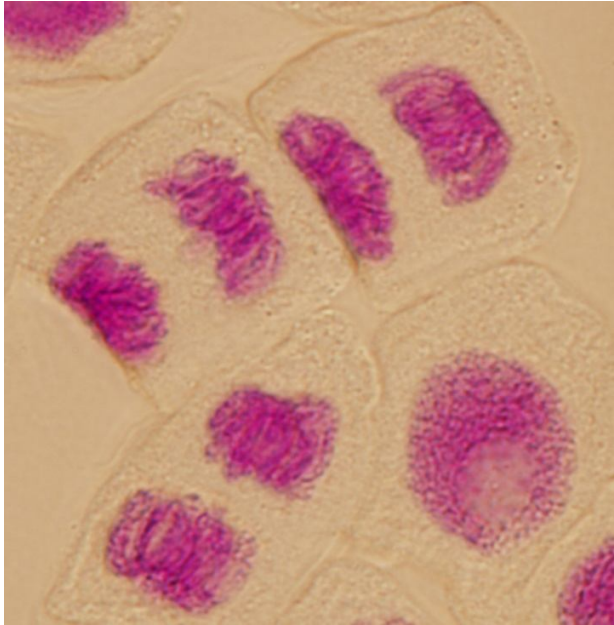
Slika 20. Sljepljivanje kromosoma u stanici boba nakon tretmana s 40 μ M talijevim(I) acetatom (povećanje 1000x).



Slika 21. Sljepljivanje kromosoma u stanici boba nakon tretmana s 40 μ M talijevim(I) acetatom (povećanje 1000x).



Slika 22. Lijevo: Normalna anafaza u kontrolnim stanicama boba. Desno: Anafazni most u stanicama luka nakon tretmana s 4 μ M talijevim(I) acetatom (povećanje 1000x).



Slika 23. Lijevo: Normalne telofaze u kontrolnim stanicama luka. Desno: Telofazni most u stanicama luka nakon tretmana s 4 μM talijevim(I) acetatom (povećanje 1000x).

5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja o učinku talija na okoliš i organizme koji ga nastanjuju su vrlo oskudna. Mehanizam toksičnosti još uvijek nije poznat, stoga talij nije moguće definirati kao mutageni, karcinogeni ili teratogeni metal (Léonard i Gerber 1997). Iako Američka agencija za zaštitu okoliša (USEPA 2002) ubraja talij među 13 najtoksičnijih metala, količina talija u okolišu se neprestano povećava. Najveći izvor onečišćenja su cementare i termoelektrane, ali i sve češća uporaba talija u visokotehnološkoj proizvodnji poluvodiča, optičkih kablova i infracrvenih detektora. Svjetska zdravstvena organizacija je još 1973. godine predložila zabranu uporabe talija. U Republici Hrvatskoj uporaba talija je zakonom zabranjena.

Talij u prirodi postoji kao monovalentni (Tl^+), odnosno trovalentni (Tl^{3+}) ion. Za živi svijet jednovalentni talij predstavlja daleko veću opasnost jer su njegovi spojevi topivi u vodi i stoga lakše ulaze u organizam. Pri tome treba uzeti u obzir činjenicu da apsorpcijom teških metala u biljnom organizmu, te akumulacijom kroz hranidbene lance potencijalno genotoksičan metal može dospjeti i do čovjeka.

U ovom istraživanju ispitivan je učinak talijeva(I) acetata na meristemske stanice korijena boba i luka. Budući da je primjena ovih biljnih vrsta uobičajena u citogenetičkim istraživanjima, one su i u ovom istraživanju odabrane kao modelni test organizmi. Prateći mitotski indeks i učestalost pojave mitotskih nepravilnosti, nastojala sam utvrditi moguća citotoksična oštećenja uzrokovana stresom uslijed izlaganja biljaka vodenim otopinama talijeva(I) acetata.

Za koncentracije talijeva(I) acetata koje sam odabrala u ovom istraživanju, prema podacima Radić i sur. (2009), poznato je da u vrsti *Vicia faba* uzrokuju oštećenja molekule DNA. Alkalnom izvedbom komet-testa autori su pokazali povećanu učestalost lomova molekule DNA sa rastućim koncentracijama talijeva(I) acetata.

Odgovori biljaka na različite vrste abiotskog stresa su mnogobrojni i različiti, no jedan od češćih je inhibicija stanične diobe.

U tu svrhu, analizirane su duljine korjenčića boba i luka koji su bili podvrgnuti 72-satnom tretmanu 4 μM i 40 μM otopini talijeva(I) acetata te duljine korjenčića pripadajućih kontrola. Ustanovljeno je da talijev(I) acetat djeluje inhibirajuće na rast biljaka (Slike 13 i 14). Kod vrste *Allium cepa* uočena je statistički značajna razlika u duljini korjenčića kontrolnih biljaka u odnosu na biljke tretirane talijem – prosječni prirast korjenčića kontrolnih biljaka nakon 72h je iznosio 30,5 mm, dok je kod biljaka tretiranih 40 μM talijevim(I) acetatom iznosio 3,31 mm. Korjenčići vrste *Vicia faba* su pokazali nešto manju ali ne statistički značajnu razliku – biljke tretirane 40 μM talijem imale su nakon 3 dana prirast 2,33 mm, dok je kod kontrolnih biljaka korjenčić izrastao u prosjeku 5,16 mm. Iz navedenih podataka vidljivo je da talij inhibira rast korjenčića kod obje biljke.

Tijekom isključivanja boba, primijetila sam da se sekundarni korjenčići teže prilagođavaju na uvjete koji nastanu prijenosom iz vlagom zasićene atmosfere Petrijeve zdjelice u vodene otopine na sobnoj temperaturi. Međutim nakon početnog 24-satnog zastoja, korjenčići kontrolnih uzoraka pokazuju normalan rast. Budući da talij nije pokazao statistički značajan inhibitorni učinak na rast nakon 72h, te da bi se uklonio mogući utjecaj stresa na rast korjenčića zbog prijenosa u vodenu otopinu, na bobu je izvršeno još jednom mjerenje duljine korjenčića nakon tretmana od 168 h. To je mjerenje pokazalo statistički značajnu razliku u duljini korjenčića između kontrolnih biljaka i onih tretiranih talijem. Nakon 7 dana kontrolnim biljkama su korjenčići u prosjeku narasli 32,76 mm, a izlaganima taliju 4,08 mm. Kopnene biljke primaju talij putem korijena i transportiraju ga u izdanak. Radić i sur. (2009) su utvrdili da bob akumulira talijev(I) acetat 50 do 250 puta više u korijenu

nego u izdanku. Uspoređujući prirast korjenčića boba nakon tretmana od 72 h i 168 h, uočeno je da učinak talijeva(I) acetata ovisi o duljini tretmana. Što je biljka dulje izložena utjecaju talija, njegov učinak na rast, tj. diobu stanica i produžni rast, je veći.

Inhibitorni učinak talija vidljiv je, osim u razlikama prirasta korjenčića tretiranih i netretiranih biljaka i na staničnoj razini.

Talij djeluje inhibirajuće na produžni rast i diobu stanica luka što se može uočiti iz vrijednosti mitotskih indeksa (Slike 15 i 16). Inhibicija diobe stanica je statistički značajna kod obje koncentracije talijeva(I) acetata u odnosu na kontrolu neovisno o trajanju tretmana, odnosno oporavka u vodi. Također, tijekom bojenja korjenčića, prilikom izrade preparata, uočila sam da se obojio vrlo mali dio vrška korjenčića tretiranih biljaka u odnosu na kontrolne uzorke, što je i vizualno upućivalo na mali broj stanica u diobi.

U meristemskim stanicama boba (Slike 17 i 18), mitotska aktivnost kontrolnih stanica je bila puno manja u odnosu na meristemske stanice korjenčića luka. Smanjenje mitotske aktivnosti, nakon 24-satnog tretmana, statistički je značajno samo pri 40 μ M koncentraciji, dok je nakon 72-satnog tretmana uočeno statistički značajno smanjenje mitotske aktivnosti ovisno o koncentraciji.

Uspoređujući učinak talija na mitotsku aktivnost stanica, luk se u odnosu na bob pokazao kao osjetljivija vrsta za procjenu genotoksičnosti, budući da su iste koncentracije talija izazvale veći inhibitorni učinak mitotske aktivnosti u luka u usporedbi s bobom. Oporavak u trajanju od 72 sata pokazao je citotoksičan učinak bez obzira na vrstu.

Liu i Kottke (2004) istraživali su mjesta akumuliranja suviška bakra u korjenčićima vrste *Allium sativum* te su otkrili da suvišak bakra dovodi do promjena u ultrastrukturi poput jake vakuolizacije, kondenzacije

kromatina, smanjenja endoplazmatskog retikuluma i ribosoma te plazmolize. Vakuole stanica iz vrška korijena bila su mjesta najveće akumulacije bakra. Zadebljali korjenčići boba nakon tretmana na talijevom(I) acetatu moguća su posljedica akumulacije talija u korijenu.

Kromosomske i mitotske aberacije koje su uočene u ovom istraživanju su mikronukleusi, C-mitoza, zaostali kromosomi, multipolarna anafaza, kromosomski fragmenti, anafazni i telofazni mostovi te sljepljivanje kromosoma.

Iako broj mikronukleusa (Slika 19) uočenih u obje vrste nije pokazivao pravilnosti u ovisnosti o koncentraciji talija, nešto veća učestalost mikronukleusa je uočena kod 72h tretmana. Također, mikronukleusi su uočeni i u kontrolnim stanicama, ali u znatno manjem broju. Mikronukleus nastaje kao posljedica loma kromosoma ili neprihvatanja kromosoma na niti diobenog vretena tijekom diobe. Iako je u meristemskim stanicama biljaka koje su rasle u otopinama talijeva(I) acetata prisutna inhibicija mitotske aktivnosti, tj. smanjena dioba stanice, uočeni mikronukleusi vjerojatno su nastali prije nego što je talij potpuno inhibirao diobu.

C-mitoza, zaostali kromosom i multipolarna anafaza su posljedica nefunkcionalnosti diobenog vretena. U vrste *Allium cepa* su samo u nekoliko slučajeva zabilježeni u stanicama biljaka tretiranih talijevim(I) acetatom, češći su kod kontrolnih biljaka zbog toga što je kod tretiranih biljaka uočena velika inhibicija diobe, odnosno nema diobe stanica koja bi dovela do vidljivih aberacija.

Kromosomski fragment posljedica je loma u strukturi kromosoma. Kromosomski fragmenti nisu uočeni u meristemskim stanicama luka. U boba su uočena sveukupno 3 kromosomska fragmenta, od čega 2 u biljaka tretiranih 4 μ M otopinom talijeva(I) acetata, a 1 kod biljke tretirane 40 μ M otopinom talijeva(I) acetata. S obzirom na veliki broj

pregledanih stanica učestalost javljanja kromosomskih fragmenata i u boba je vrlo niska.

Kao promjene u strukturi kromatina uočeni su anafazni (Slika 22) i telofazni mostovi (Slika 23) te sljepljivanje kromosoma (Tablica 2 i 3). Anafazni mostovi uočeni su i u kontrolnih i u tretiranih biljaka, ali u vrlo malom broju. Najučestalija aberacija je sljepljivanje kromosoma s većom učestalošću u tretiranih biljaka u odnosu na kontrolne.

Iako su uočene različite vrste aberacija, sveukupan broj aberacija u analiziranim stanicama nije velik jer talij djeluje citotoksično, odnosno zaustavlja diobu meristemskih stanica. S obzirom na to da kromosomske aberacije postaju vidljive tijekom ili nakon diobe stanice, u meristemskim stanicama ispitivanih biljaka nema mnogo kromosomskih aberacija jer je stanični ciklus zaustavljen u nekoj fazi. Stoga, iako je ovim istraživanjem nedvojbeno uočen citotoksičan utjecaj talijeva(I) acetata, broj i vrsta kromosomskih aberacija ne daju potpunu sliku genotoksičnog učinka talija na meristemske stanice boba i luka.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja genotoksičnog učinka talijeva(I) acetata na meristemske stanice boba i luka pokazali su sljedeće:

- Teški metal talij djeluje citotoksično, odnosno uzrokuje inhibiciju stanične diobe, makroskopski vidljivo iz malog prirasta duljine korjenčića, a na staničnoj razini uočeno kao smanjena mitotska aktivnost stanica;
- Budući da je dioba stanica nužan preduvjet za nastanak kromosomskih aberacija, a s obzirom na to da talij djeluje inhibirajuće na diobu stanica, nije uočen velik broj kromosomskih aberacija;
- Obični luk (*Allium cepa* L.) osjetljivija je vrsta od boba (*Vicia faba* L.) te je stoga pogodnija za citogenetička istraživanja učinka talija.

7. LITERATURA

- Cotelle S., Masfaraud J.-F., Férard J.-F. (1999): Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 167-171.
- Emsley J. (2001): Nature's Building blocks. An A-Z Guide to the Elements. Oxford University Press, Oxford.
- Fenech M. (2000): The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
- Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- Fernandes T. C. C., Mazzeo D. E. C., Marin-Morales M. A. (2007): mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 252-259.
- Fiskesjö G. (1985): The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-112.
- Fiskesjö G. (1988): The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197: 243-260.
- Frattini P. (2005): Thallium properties and behaviour – A literature study. Geologian tutkimuskeskus. Etelä-Suomen yksikkö, S41/0000/2005/2.
- Grant W.F. (1982): Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research* 99: 273-291.
- Grant W. F. (1994): The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310: 175-185.
- Grant W. F. (1999): Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research* 426: 107-112.

- John Peter A. L., Viraraghavan T. (2005): Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31: 493-501.
- Léonard A., Gerber G. B. (1997): Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research* 387: 47-53.
- Liu D., Kottke I. (2004): Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by energy loss spectroscopy (EELS). *Bioresource Technology* 94: 153-158.
- Ma T.-H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H. (1995): The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 334: 185-195.
- Migid A. H.M., Azab Y. A., Ibrahim W. M. (2007): Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 57-64.
- Radić S., Cvjetko P., Glavaš K., Roje V., Pevalek-Kozlina B. and Pavlica M. (2009): Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (1): 189-196
- Rank J., Nielsen M. H. (1997): *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 390: 121-127.
- Russel P. J. (2002): Chromosomal mutation. Cummings B. (Ed.), *Genetics*. Pearson Education Inc., San Francisco, 595-621.
- Sharma A. K., Sharma A. (1972): Chromosome techniques. Theory and practice. Butterworth & Co (Publishers) LTD, London.
- USEPA (Environmental Protection Agency) (2002) Technical factsheet on: Thallium. <http://epa.gov/safewater/dwh/t-ioc/thallium.html>