

A REVIEW ABOUT PHYTOTOXICITY WITH A FOCUS ON THE *ALLIUM* TEST

Daniela-Georgiana CIOBANU

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

*Corresponding author e-mail: daniela.ciobanu98@e-uvv.ro

Received 1 August 2019; accepted 22 November 2019

ABSTRACT

In the last decades, with the increase in the number of xenobiotic substances, which affects humans directly or indirectly, but also taking into account the legislation on animal experiments, it emerged imperiously necessary the development of some assessments to testify the toxicity of substances, without involving animal life or exaggerated costs. Plants are suitable materials for testing the toxic potential of some substances. The Allium test is one of the most widely used phytotoxicity tests, presenting multiple advantages such as: easy to purchase and preserve plant material, minimal costs, high sensitivity.

KEY WORDS: *phytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity, mitotic index, basal cytotoxicity*

1. Fitotoxicitatea și testele bazate pe materiale vegetale

Creșterea dramatică a numărului de compuși xenobiotici influențează mediul înconjurător, multe dintre substanțele chimice deja existente reprezentând amenințări toxicologice ale biosferei și chiar mai mult, fapt din care reiese necesitatea unor examinări prin metode toxicologice potrivite. Din motive etice și economice dar și datorită noilor legi cu privire la protecția animalelor, numărul experimentelor pe animale trebuie redus cât de mult se poate atunci când se testează xenobiotice. Modul de acțiune al diferitelor substanțe mutagene, implicațiile lor pe termen lung în sănătatea umană, reprezintă obiective științifice prioritare (Șuțan et al., 2014).

În sensul testării toxicității anumitor substanțe chimice, plantele superioare reprezintă sisteme potrivite pentru o gamă mare de teste toxicologice aplicabile în estimarea riscurilor asupra mediului înconjurător, asupra ecosistemelor și, în anumite cazuri, asupra vertebratelor.

Culturile de celule și țesuturi de origine animală și umană au fost deja utilizate ca o alternativă pentru testarea diferitelor clase de chimicale

(Clemdson et al., 1996; O Hare & Atterwill, 1995). Există însă un interes crescând în dezvoltarea unor proceduri precise *in vitro*, inițial pentru reducerea utilizării testelor pe animale și oameni, iar în final pentru înlocuirea totală a acestora.

După Lowe et al. (1995), există probleme fundamentale și continue asociate cu utilizarea culturilor celulare și tisulare de origine animală. Acestea includ aplicabilitatea redusă a celulelor animale, respectiv umane, nediferențiate și lipsa lor relativă de valoare ca modele de răspuns *in vivo* dar și pierderea caracteristicilor lor de diferențiere în timp în culturile *in vitro*. În plus, culturile celulare umane și animale necesită un mediu de cultură complex, a cărui stabilitate este foarte dificil de menținut pe durata unor experimente de lungă durată. Probabilitatea interacțiunii dintre substanțele de testat și componentele mediului de cultură crește cu creșterea complexității mediului. Toate aceste dezavantaje includ proceduri complicate, experimente ce se întind de obicei pe o perioadă lungă de timp și costuri relativ mari. Însă aceste neajunsuri pot fi evitate dacă sunt utilizate materiale de origine vegetală, ca de exemplu plante întregi, semințe, organe, țesuturi sau doar celule.

Unul dintre cele mai utilizate teste în această categorie este testul de genotoxicitate *Allium* (sau simplu Testul *Allium*) care se bazează în special pe observații microscopice ale aberațiilor survenite în timpul mitozei și citokinezei și ale efectelor ulterioare pe cromozomi, în zona de diviziune a rădăcinii la plantele din genul *Allium*. În plus față de testul *Allium*, alte câteva teste bazate pe plante au fost dezvoltate pentru screening-ul toxicității. Printre acestea, așa numitul test al micronucleilor, ce utilizează muguri floriali de la *Tradescantia*, fiind este un test foarte bine optimizat și utilizat frecvent (Ma, 1982; Underbrink et al., 1973). Acest test este bazat pe producerea de micronuclei în perii staminali și în celulele-mamă ale grăuncioarelor de polen, cauzată de influențe genotoxice pe durata proceselor de meioză. Acest test a fost aplicat cu succes pe numeroși agenți cu implicații în sănătatea umană și pe poluanți ai mediului înconjurător (Ma et al., 1984).

Testul *Allium* a primit o mare atenție după ce a fost adaptat în screening-ul poluanților solului și apei cum ar fi acizii clorofenoxiacetici și clorofenolii (Fiskesjo et al., 1981), aluminiul (Berggren & Fiskesjo, 1987), sărurile metalelor grele (Liu et al., 1995), alte deșeuri chimice industriale (Fiskesjo, 1985), și pesticide (Franekic et al., 1994).

Rădăcinile răsadurilor de cereale crescute în diverse soluții reprezintă, de asemenea, un sistem simplu pentru estimarea toxicității metalelor din sol și apă, prin determinarea greutateii rădăcinilor. Efectele interactive ale aluminiului, cadmiului, manganului, nichelului și zincului asupra creșterii rădăcinilor de

Triticum aestivum au fost analizate ca model la răspunsul plantelor la stresul provocat de metale și la identificarea interacțiunilor aditive, antagonice, sinergetice sau multiplicatorii (Taylor, 1989). A fost urmărit și efectul inhibitor al ierbicidelor pentru controlul *Poaceelor* prin măsurarea regenerării rădăcinii după îndepărtarea rădăcinii la *Avena* și a răsadurilor la *Glycine* (Fedtke, 1987).

Plantele cu creștere rapidă, cum ar fi *Sinapis alba* sau *Lactuca*, au fost utilizate pentru testarea efectelor toxice ale esterilor benzonitrilici, ale anestezicelor și ale barbituriceelor (Kordan, 1988). În plus față de inhibarea creșterii rădăcinilor, capacitatea de producere a antocianilor în rădăcini și lăstărirea răsadurilor de porumb au arătat o scădere odată cu creșterea solubilității lipidelor datorată efectelor barbituriceelor (Kordan & Rengel, 1998).

Au fost utilizate ocazional coleoptilele unor răsaduri de cereale, lăstari sau segmente de lăstari, frunze de la răsaduri monocotiledonate și dicotiledonate, în locul rădăcinilor, în vederea screening-ului toxicității (Jung et al., 1986; Cutler & Jarvis, 1985). Într-o abordare timpurie a examinării efectelor fitotoxice ale surfactanților, întreaga creștere a răsadurilor cultivate in vitro a fost estimată prin determinarea greutateii plantelor proaspete după un timp lung de incubare (150-270 de zile) cu concentrații diferite din substanța de testare (Ernst et al., 1971). Prin acest test, a fost demonstrat că surfactanții non-ionici reduc creșterea și viabilitatea răsadurilor la concentrații mai scăzute decât surfactanții ionici.

Dintre toate testele de genotoxicitate utilizate de-a lungul timpului, numai testul *Allium*, testul micronucleilor *Tradescantia*, și testul de mutagenitate *Arabidopsis*, au fost evaluate alături de testele de carcinogenitate aplicate vertebratelor. Însă, cu excepția testului *Arabidopsis*, abilitatea acestor teste de a prezice capacitatea carcinogenetică a fost relativ mică (Ennever et al., 1988).

Deși câteva sute de substanțe chimice au fost deja testate prin sisteme de screening bazate pe plante, există totuși o hibă imensă în înțelegerea mecanismelor de acțiune ale toxinelor în plantele superioare. Aceste mecanisme includ calea de absorbție și acumularea intracelulară a substanței chimice, situsurile celulare și modurile de acțiune, deteriorarea structurilor celulare, cinetica toxifierii și detoxifierii și relația structură-activitate a compusului. Au fost efectuate, pentru a investiga modificările structurale și deteriorarea celulelor rădăcinii cauzate de anumite ierbicide utilizate frecvent, numeroase teste. Semințele de mazăre, fasole, bob și porumb au fost supuse unor concentrații diferite de clorsulfuron, metsulfuron metil, trialat și norflurazon (substanțe active din diverse erbicide). Observații la microscopul electronic au dezvăluit diferite tipuri de schimbări în vârfurile rădăcinii. Straturile celulare secretoare și centrele de percepție a gravității de la nivelul vârfului rădăcinilor

au fost afectate sever (Fayez et al., 1994; Fayez & Kristen, 1996). În plus la aceste efecte, cromatina nucleară a fost alterată în celulele din vârful rădăcinii (Flaburiani & Kristen, 1996), și stresul survenit în urma aplicării substanțelor a fost reflectat printr-o creștere a conținutului de prolină în rădăcină (Fayez & Kristen, 1996). Reducerea creșterii rădăcinilor primare a fost corelată cu concentrațiile de ierbicide utilizate. Toate aceste rezultate indică faptul că rădăcinile răsadurilor tinere reprezintă modalități de testare potrivite, nu doar pentru screening-ul poluanților, dar și pentru studiile mecanismelor efectelor toxice.

Diferite teste, bazate pe germinarea polenului și/sau testul bazat pe creșterea tubilor poliniferi au contribuit de asemenea la înțelegerea mecanismelor de acțiune toxică a poluanților mediului. Examinările la microscopul electronic ale efectelor toxice ale metalelor grele și ale trietilului pe tubi crescuți *in vitro* de la plante de *Lilium* (Roderer & Reiss, 1988; Sawidis & Reiss, 1995) și tubi poliniferi de *Nicotiana* (Kandasamy & Kristen, 1989) au oferit o nouă perspectivă asupra mecanismelor de inhibiție a creșterii. Metalele grele au interferat în primul rând cu procesele de secreție și procesele de formare a peretelui celular. La vârful acestei regiuni, peretele celular devine neobișnuit de subțire datorită acumulării anormale de material vezicular derivat din aparatul Golgi; ca și consecință, creșterea vârfului rădăcinii a fost inhibată. Datorită rolului important pe care îl are gradientul de calciu în membrana plasmatică la vârful tubilor poliniferi, sinteza peretelui celular poate fi modificată indirect prin interferența metalelor cu canalele de calciu din plasmalemă. În general, parametrii luați în considerare atunci când se stabilește potențialul toxic al unor substanțe sunt inhibarea creșterii și moartea celulară, aceștia reflectă interferența substanțelor citotoxice cu structurile celulare și/sau funcțiile esențiale pentru creșterea sau supraviețuirea oricărei celule eucariote. Această teză, în mare bazată pe conceptul de citotoxicitate bazală la mamifere (Barile, 1994) a fost utilizată recent pentru a stabili modelul acțiunilor toxice și a interacțiilor într-o celulă ipotetică (Kristen, 1996). Țintele celulare ale posibilului impact toxic au fost respirația, transportul, fluxul membranal și sinteza de proteine, lipide, carbohidrați. Toate aceste ținte sunt prezente în majoritatea tipurilor de celule eucariote. Celulele vegetale fără cloroplaste (celulele meristemice de exemplu) nu diferă mult de celulele animale în ceea ce privește furnizarea de informații despre toxicitate, dacă se ia ca și obiectiv citotoxicitatea bazală. Termenul de "citotoxicitate bazală" este folosit aici conform următoarei definiții: toxicitatea bazală celulară, este leziunea chimică a structurilor și/sau funcțiilor majorității celulelor eucariote incapabile de fotosinteză (Kristen, 1996).

O „baterie de teste” *in vitro*, alcătuită din sisteme de celule animale sau vegetale fără cloroplaste, ar putea acoperi un procent mare din efectele toxice și ar putea reduce necesitatea multor teste *in vivo* pe animale.

Este posibil ca niciunul dintre testele descrise aici să nu atingă un nivel maxim de acuratețe în vederea înlocuirii/reducerii metodelor *in vivo* pe animale în domeniul toxicologiei vertebrate/umane. Unele teste sunt prea „încete” pentru detectarea rapidă a toxicității acute (de exemplu cele ce implică semințe de orhidee, cereale, legume și castraveți); altele prezintă un anumit handicap la nivelul peretelui celular sau de incapacitatea lor de a rămâne fără perete celular (de exemplu culturile de celule vegetale și testele pe protoplaste). Dacă protoplastele plantelor superioare ar putea fi păstrate stabile pentru câteva ore, atunci ar reprezenta instrumente esențiale pentru testele de iritație ale pielii și ochiului pentru că plasmalema lor nudă, foarte sensibilă, este în principiu, similară cu membrana plasmatică a celulelor vertebrate.

Alte materiale prelevate de la plantele superioare cum ar fi segmente de lăstari, frunze și răsaduri verzi, sunt specializate pentru detecția toxicității unor substanțe chimice (de exemplu ierbicide) ce afectează fotosinteza. Deși aceste teste nu sunt candidate la testarea toxicității vertebratelor/oamenilor, ele nu sunt complet insignifiante în ceea ce privește testarea chimicalelor ce sunt toxice pentru mediu și indirect pentru oameni.

În plus față de argumentele etice împotriva experimentelor pe animale, există câteva motive biologice, tehnice și economice în favoarea metodelor de testare a toxicității pe plante dacă există un interes pentru citotoxicitatea bazală. În contrast cu culturile celulare umane/animale nediferențiate, celulele și țesuturile vegetale în suspensie sunt capabile să producă celule diferențiate și apoi să genereze indivizi uniformi din punct de vedere genetic și fertili. Acest avantaj crucial al plantelor poate fi utilizat pentru a forma clone ale diferitelor specii ca o sursă de semințe și polen omogene. Mai mult, pierderea caracteristicilor de diferențiere *in vitro* cu timpul, ceea ce se întâmplă foarte des în culturile de celule animale, este rar întâlnită în culturile de celule vegetale dacă se utilizează un mediu de cultură corespunzător.

Oricum, cele mai multe metode *in vitro* bazate pe plante nu necesită un mediu de cultură pentru menținerea pe termen lung al capacităților de diferențiere deoarece ele se pot conserva sub formă de semințe și grăuncioare de polen uscate, pentru cel puțin un an. Această abilitate se bazează pe cantitatea extrem de mică de apă a materialului, în contrast cu țesuturile vertebratelor. Materialul frecvent utilizat în testele bazate pe plante este foarte ușor de manipulat. Semințele cerealelor și alte plante de cultură, la fel ca polenul multor specii, reprezintă o sursă aproape inepuizabilă și ieftină de material biologic unic pentru producerea de răsaduri. Mediile de cultură pentru

germinarea *in vitro* și creșterea acestor materiale sunt extrem de simple deoarece semințele și grăuncioarele de polen conțin de obicei suficiente nutrimente pentru a furniza energie pentru câteva zile.

Oricum, validarea oricui test bazat pe plante alături de teste pe vertebrate reprezintă o condiție prealabilă pentru acceptarea sa ca o metodă alternativă pentru testarea toxicității.

2. Testul *Allium*

Testul *Allium* a fost introdus de către Levan (Levan, 1938) pentru studiul efectelor colchicinei asupra creșterii rădăcinilor, și a fost utilizat apoi ca o metodă standard în studiul aberațiilor cromozomiale (Grant, 1982). Levan a ajuns la concluzia că efectul colchicinei este specific și reversibil. Colchicina acționează la nivelul fusului de diviziune, inactivându-l. Modificările survenite în diviziunea celulară sub acțiunea colchicinei se abreviază prin „mitoza-c”. În anii următori Fiskesjo, a elaborat protocoale cu privire la tehnica de realizare a testului *Allium*, îmbunătățind testul și modelându-l pe necesitățile experimentale. Astfel, procedura de realizare a testului *Allium* poate urmări fie forma *originală* a testului *Allium*, în care rădăcinile cresc în apă pură (ex. apă potabilă de bună calitate). Când rădăcinile au atins lungimea de 1-2 cm, se începe aplicarea tratamentelor la intervale bine stabilite de timp (ex. 4 h sau 24 h). Pentru studiul detaliat al configurației cromozomilor (ex. ruperea cromozomilor sau a cromatinei), se poate realiza un tratament adițional pentru 1-2 h cu 0,1% colchicină, înainte de pregătirea lamelor de examinat. Protocolul poate urmări și forma *modificată* a testului *Allium*, cepele sunt plasate direct în lichidul de testare. Lichidele de testat ar trebui schimbate zilnic. Însă pentru a reduce consumul de substanțe, se vor înlocui doar cantitățile ce s-au evaporat. (Fiskesjo, 1985).

Când o celulă vie este expusă la acțiunea unei substanțe chimice, aceasta din urmă poate produce următoarele efecte: fie efecte toxice ce împiedică creșterea sau omoară celula, fie efecte genotoxice, ca de exemplu ruperea cromozomilor sau mitoza-c, în ambele cazuri existând posibilitatea transferului efectelor defectuoase următoarelor generații celulare (Fiskesjo, 1994). Pentru studiul toxicității, Fiskesjo (Fiskesjo, 1985) propune o listă de parametrii macroscopici standard, ce trebuie urmăriți în studiul toxicității anumitor compuși, cel mai important parametru macroscopic fiind lungimea rădăcinii. Există și alți parametrii care pot servi la teste preliminare, necesare în stabilirea concentrațiilor substanțelor de testat, cum ar fi: *restricționarea creșterii frunzelor verzi*, *turgescența* (duritatea vârfurilor rădăcinii; este un parametru ce evidențiază gradul de toxicitate; la tratamente cu un grad mare de toxicitate rădăcinile vor slăbi și vor muri, astfel acest parametru fiind

folositor în general în teste preliminare pentru stabilirea concentrațiilor pentru experiment) și *schimbarea culorii* (pe durata experimentului vârful rădăcinilor, la fel ca și întreaga plantă, își pot schimba culoarea, fie datorită unui tratament cu o sare anume, cum ar fi albastru-verde de la suflatul de cupru, fie vârfulurile pot deveni maronii din cauza efectelor toxice ce duc la moartea celulelor). Ca și parametri standard sunt enumerați: *forma rădăcinii*: *formarea tumorilor* (umflarea vârfulurilor rădăcinilor, concomitent cu mitoză-c; acest fenomen este observabil după 3-5 zile; *îndoirea rădăcinilor sau a vârfulurilor rădăcinilor* (poate avea loc de exemplu, după tratamente cu săruri metalice) și *lungimea rădăcinilor*. Orice efect vătămător are repercusiuni, directe sau indirecte, în inhibarea creșterii rădăcinilor (Fiskesjo, 1995). Lungimea rădăcinilor poate fi măsurată în două moduri: în mod normal, lungimea întregii rădăcini este măsurată cu un liniar în afara tubului de testare, o metodă ce dă o singură valoare pentru fiecare bulb. Această metodă permite continuarea experimentului. O metodă mai precisă de măsurare este reprezentată de măsurarea fiecărei rădăcini a fiecărui bulb, necesitând tăierea acestora și finalizarea experimentului.

Genotoxicitatea se referă la capacitatea agenților clastogeni de a cauza leziuni în materialul genetic (Tedesco & Laughinghouse, 2012). În studiul genotoxicității se iau în calcul anumiți parametri microscopici care oferă informații adiționale în legătură cu gradul de toxicitate al compusului studiat. Indexul mitotic și caracterizarea mitozei sunt parametrii cei mai studiați la acest nivel. Anumite caracteristici apărute în cursul mitozei pot furniza detalii importante: apariția anafazei timpurii (grupurile de anafază nu sunt complet separate, un număr ridicat indică o scădere a vitezei de diviziune celulară), cromozomii lipicioși (indică toxicitate mare, de obicei ireversibilă, ce au ca și efect probabil moartea celulară), punți între cromozomi și/sau fragmente cromozomiale (rezultate din ruperea cromozomilor sau a cromatidelor), cromozomi „vagrant” (efect slab în mitoză-c, indică risc de aneuploidie), mitoză-c (efect toxic mic, poate fi reversibil, are loc după deformarea fusului de diviziune). Indexul mitotic reprezintă raportul dintre numărul de celule aflate în mitoză și numărul total de celule (Dragoewa et al., 2015)

Testul *Allium* are multiple domenii de aplicare, prin intermediul acestuia fiind testate atât substanțe cunoscute (pentru determinarea intervalului de pH, substanțe solubile sau insolubile în apă) cât și substanțe necunoscute, în general regăsite în apa potabilă, în apele naturale sau în deșeurile menajere (Fiskesjo, 1985).

Testul *Allium* prezintă anumite avantaje și dezavantaje. Dezavantajele se leagă în principiu de compoziția chimică a substanțelor de testat. De exemplu, pentru testarea mixturilor în care se găsesc compuși insolubili în apă,

este necesară solubilizarea în prealabil a acestora cu cantități cât mai mici de reactivi precum etanolul, metanolul, cloroformul etc., aceste substanțe putând introduce erori în rezultatele testului (Fiskesjo, 1993). Un alt dezavantaj se leagă de sensibilitatea ridicată a testului, spre exemplu, pot exista efecte pozitive în cazul testului *Allium* atunci când se testează compuși care în mod normal nu sunt considerați dăunători atunci când se iau în considerare organisme mai mari (de exemplu când se realizează teste pe pești), din acest motiv extrapolarea rezultatelor testului la un alt sistem de test (și eventual la oameni) ar trebui să fie bazat pe rezultatele unei „baterii de teste”, luând în considerare căile metabolice ale compusului testat (Fiskesjo, 1995). Un alt dezavantaj al testului *Allium* este acceptarea generală, problemă întâlnită la toate sistemele de test pe plante, datorită faptului că celulele vegetale sunt diferite din punct de vedere fiziologic și depărtate din punct de vedere filogenetic de celulele animale (Grant, 1982). Totuși, celulele rădăcinii de *Allium cepa*, la fel ca și tubii poliniferi crescuți *in vitro*, sunt lipsite de cloroplaste, sunt sisteme non-fotosintetizatoare și, prin urmare, grație reacțiilor lor citotoxice sunt mai apropiate de țesuturile și celulele vertebratelor față de organele plantelor ce conțin cloroplaste (Kristen, 1997). Avantajele testului *Allium* sunt însă mult mai numeroase în raport cu dezavantajele prezentate. Un avantaj de bază al acestui test este timpul scurt în care se poate desfășura experimentul propriu-zis: două zile pentru pregătirea cromozomilor și aproximativ 3-4 zile pentru măsurarea creșterii rădăcinilor. De asemenea materialul utilizat (bulbii de ceapă) sunt ieftini, ușor de obținut, depozitat și manipulat, iar echipamentul necesar este minimal: recipiente, rafturi pentru recipiente, microscop optic, aparat de fotografiat (Fiskesjo, 1993). Alegerea materialului pe care se desfășoară experimentul este potrivită deoarece: ceapa (*Allium cepa* L.) are o dinamică de creștere a rădăcinii foarte sensibilă la poluanți, fazele mitotice sunt foarte clare la ceapă, are număr stabil de cromozomi ($2n=16$), cromozomii prezintă diversitate morfologică, prezintă răspuns clar și rapid la substanțe genotoxice, au loc rar deteriorări cromozomiale spontane (Firbas & Amon, 2013). *Allium cepa* L. ($2n=16$) este cel mai folosit material vegetal pentru studiul toxicității, însă și alți membri ai genului, cum ar fi *A. carinatum* L. ($2n=16$), *A. cepa* var. *proliferum* ($2n=16$), *A. fistulosum* L. și *A. sativum* L. ($2n=16$), sunt folosiți pentru teste de mutagenitate, totuși cea mai largă utilizare o are *A. cepa*. În cariotip, *A. cepa* prezintă 8 perechi de cromozomi după cum urmează: 5 perechi de cromozomi cu centromerul situat metacentric spre submetacentric (cromozomii 1,2,3,5,8); două perechi cu centromerul amplasat submetacentric (cromozomii 6,7); și o pereche de cromozomi cu sateliți (cromozomul 4). Cromozomii sunt relativ mari, cu o medie de 10 μm , ceea ce face ca observațiile la acest nivel să fie

simple (Grant, 1982). În plus, testul *Allium* reprezintă un model *in vivo* excelent, în care rădăcinile pot crește în contact direct cu substanțele de interes (Tedesco & Laughinghouse, 2012).

Testul *Allium* combină două obiective: mutagenitatea și toxicitatea. Toxicitatea este măsurată prin observarea inhibării creșterii rădăcinilor iar mutagenitatea este corelată cu rata ruperii cromozomilor (sau aberații observate la acest nivel). Sensibilitatea testului *Allium* este la același nivel ca, de exemplu, sistemele de testare ce utilizează alge sau limfocite umane. Multe teste pe diverse organisme, au dat rezultate similare, comparabile cu rezultatele testului *Allium*, fapt ce face ca acest test să fie un test de încredere ca și test de screening (Fiskesjo, 1985).

CONCLUZII

Testele de fitotoxicitate necesită o atenție deosebită în vederea optimizării și modelării lor pe necesitățile apărute sub influența factorilor antropici. Testele de fitotoxicitate reprezintă alternative ieftine și eficiente la testele clasice de toxicitate. Direcția de cercetare din ultimii ani merge spre dezvoltarea unor sisteme de test care să intre în alcătuirea unei „baterii de teste” cu scopul înlocuirii totale sau parțiale într-un procent mare al experimentelor efectuate pe vertebrate.

BIBLIOGRAFIE

- Barile F.A. 1994 Introduction to In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms and Methods. Boca Raton: CRC Press. 222p
- Berggren D., Fiskesjo G. 1987. Aluminum toxicity and speciation in soil liquids-experiments with *Allium cepa* L. *Environmental and Toxicological Chemistry*. 6:771-779
- Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al. 1996. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part II. *In vitro* results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and comparative cytotoxicity analysis. *ALTA*. 24(1):273-311
- Cutler H.G., Jarvis B.B. 1985. Preliminary observations on the effects of macrocyclic trichotecenes on plant growth. *Environmental and Experimental Botany*. 25:115-128
- Dragoeva A.P., Koleva V.P., Nanova Z.D., Georgieva B.P. 2015. Allelopathic Effects of *Adonis vernalis* L.: Root Growth Inhibition and Cytogenetic Alterations. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. 4: 48-55
- Ennever F.K., Andreano G., Rosenkrantz H.S. 1988. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutation Research*. 205:99-105
- Ernst R., Arditti J., Healey P.L. 1971. Biological effects of surfactants. I. Influence on the growth of the orchid seedlings. *New Phytologist*. 70:457-475
- Fayez K.A., Gerken I., Kristen U. 1994. Ultrastructural responses of root caps to the herbicides chlorsulfuron and metsulfuron methyl. *Plant and Soil*. 167:127-134
- Fayez K.A., Kristen U. 1996. The influence of herbicides on the growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps. *Environmental and Experimental Botany*. 36:71-81
- Fedtke C. 1987. Physiological activity spectra of existing graminicides and the new herbicide 2-(2-benzothiazolyl-oxy)-N-methyl-N-phenylacetamide (megenacet). *Weed Research*. 27:221-228
- Fiskesjo G. 1995. Allium Test, pp. 119-127. In: *In vitro Testing Protocols*. O'Hare S., Atterwill C.K. (eds.), Humana Press Inc, Totowa, NJ.

CIOBANU: A review about phytotoxicity with a focus on the *Allium* test

- Fiskesjo G. 1994. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Chromosomes and Cell Divisions in Root Tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. 9:245-241.
- Fiskesjo G. 1993. The Allium Test in Wastewater Monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. 8:291-298.
- Fiskesjo G. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102: 99-112.
- Fiskesjo G., Lassen C., Renberg L. 1981. Chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified Allium test. *Chemico-Biological Interactions*. 34:333-344
- Firbas P., Amon T. 2013. Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 4(4)
- Flaburiani A., Kristen U. 1996. The influence of chlorsulfuron and metsulfuron methyl on root growth and on the ultrastructure of root tips of germinating maize seeds. *Plant and Soil*. 180:19-28
- Franekic J., Bratulic N., Pavlika M., Papes D. 1994. Genotoxicity of thiocarbamates and their metabolites. *Mutation Research*. 325:65-74
- Grant W.F. 1982. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 99:273-291.
- Jung J., Rentzea C., Rademacher W. 1986. Plants growth regulation with triazoles of the dioxanyl type. *Journal of Plant Growth Regulation*. 4:181-188
- Kandasamy M.K., Kristen U. 1989. Influence of triethyllead on growth and ultrastructure of tobacco pollen tubes. *Environmental and Experimental Botany*. 29:283-292
- Kordan H.A. 1988. Barbiturate effects on germinating plant seedlings. *ATLA*. 15:251-254
- Kordan H.A., Rengel Z. 1998. Impaired anthocyanin production in barbiturate-treated *Zea mays* seedlings. *Annals of Botany*. 61:221-223
- Kristen U. 1996. Main features of basal cytotoxicity: sites of toxic action and interaction in the pollen tube cell. *ATLA*. 24:429-434
- Kristen U. 1997. Use of Higher Plants as Screens for Toxicity Assessment. *Toxicology in Vitro*. 11: 181-191
- Levan A. 1938. The effect of colchicine on root mitoses in Allium. *Hereditas*. 24:471-486.
- Liu D., Jiang W., Wang W., Zhai L. 1995. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the Allium test. *Israel Journal of Plant Science*. 43:125-133
- Lowe K.C., Davey M.R., Power J.B., Clothier R.H. 1995. Plants as toxicity screens. *Pharmaceutical News*, 2:17-22
- Ma T.H. 1982. *Tradescantia* cytoogenetic tests (root tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother cells). *Mutation Research*. 99:293-302
- Ma T.H., Harris M.M., Van Anderson A., Ahmed I., Mohammad K., Bare J.L., Lin G. 1984. *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) test on 140 health-related agents. *Mutation Research*. 138:157-167
- O'Hare S., Atterwill C.K (eds.) 1995. In Vitro Testing Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 43. Humana Press, Totowa, NJ, 332 p.
- Roderer G., Reiss H.D. 1988. Different effects of inorganic and triethyl lead on growth and ultrastructure of lily pollen tubes. *Protoplasma*. 144:101-109
- Sawidis T., Reiss H.D. 1995. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma*. 185:113-122
- Șuțan N.A., Popescu A., Mihăescu C., Soare L.C., Marinescu M.V. 2014. Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide Ridomil in *Allium cepa* L. *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală*. 60, 1: 5-12.
- Taylor G.J. 1989. Multiple metal stress in *Triticum aestivum*: differentiation between additive, multiplicative, antagonistic and synergistic effects. *Canadian Journal of Botany*. 62:2272-2276
- Tedesco S.B., Laughinghouse H.D. 2012. Bioindicator of genotoxicity: the Allium cepa test. Environmental contamination, p. 137-156.
- Underbrink A.G., Schairer L.A., Sparrow A.H. 1973. *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In *Chemical Mutagenesis: Principles and Methods for their Detection*. Hollaender A. (ed.), Vol. 3. Plenum Press, New York