

Bor Fazlalığının Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv. Sambro No.5) Bitkisinin İn Vitro koşullarda Kök Gelişimi ve Anatomisi Üzerine Etkileri

Esin AKÇAM OLUK¹ Hatice DEMİRAY² Dilek YARDIM³

Summary

In Vitro Effects of Excess Boron on Root Development and Anatomy of Sunflower (*Helianthus annuus* L.cv. Sambro No.5) Plant

In our study, the effects of excess boron which is a strategic mineral for Turkey and necessary for plants as a micro element has been researched on root development of sunflower (*Helianthus annuus* L.cv. Sambro No.5).

The seeds of sunflower germinated under in vitro conditions. Murashige-Skoog recipe was used as nutrient medium. The amount of boron was adjusted by changing the amount of boric acid four times fold (24.8 mg/l) than its normal amount in recipe. The excess boron resulted a reduction in the xylem arch numbers of vascular tissue of root from 8 to 4 numbers besides an increase in lateral root formation as determined in anatomical and morphological observations.

Key words: Sunflower, boron, xylem archs.

Giriş

Bor toksisitesi tür içinde varyasyonlar meydana getirip, varyetelerin ortaya çıkmasına sebep olurken, bitki büyümesi üzerinde de genellikle olumsuz yönde olan değişiklikler ortaya koymaktadır (Oertli ve Kohl, 1961). Borun yüksek dışsal konsantrasyonlarının absorpsiyonunu düzenleyen aktif mekanizma, borik asit molekülünün yüksek membran permeabilitesine sahip yapısı nedeniyle kısa sürelerde

¹ Yard. Doç.Dr.,Ege Üniv. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100, Bornova-İzmir/TÜRKİYE, esin.akcam@ege.edu.tr

² Araş. Gör., Dr., Ege Üniv. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100, Bornova-İzmir/TÜRKİYE.

³ Biolog Ege Üniv. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100, Bornova-İzmir/TÜRKİYE.

etkin olmaktadır, uzun süreli bor elementine maruz kalışlarda ise, köklerce bor absorpsiyonunun pasif taşınımıyla gerçekteği rapor edilmektedir (Raven, 1980). Bu çalışmada da, *in vitro* şartlarda ortamdaki bor fazlalığının ayçiçeği bitkisinin kök gelişimi ve anatomisi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda Menemen Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin ettiğimiz sertifikalı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv. Sambro No.5) tohumları kullanılmıştır.

In vitro şartlarda gerçekteştirilen denemelerimizde kontrol ortamı (a) olarak Murashige-Skoog (MS) (1962) reçetesi kullanılıp, uygulama ortamı (b) MS ortamındaki borik asit miktarı 4 kat arttırılarak (6,2x4=24,8 mg/lt) hazırlanmıştır. Çalışmalarımız 50 adet kontrol ve 50 adet uygulama ortamı üzerinde yürütölmüştür.

Tohumlara yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Bu işlem için bir behere 2/3 oranında klorak, 1/3 oranında saf su koyup, bu karışım içinde tohumlar 10-15 dakika çalkalanmak suretiyle bekletilmıştir. Daha sonra steril saf su ile iyice durulanan tohumlar, %96'lık etil alkol içinde 5 dakika bekletilmış ve son olarak alkolü gidermek için distile su ile yıkanmıştır. Bu işlemler her ekimden önce tohumlara uygulanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu gerçekteştirilen tohumlar 20' şer ml kontrol ve uygulama ortamı içeren 100 ml' lik erlenlere 2' şer adet ekilmıştir. Bu şekilde hazırlanan költürler 25°C de karanlıkta inkübe edilmiştir. Çimlenme gerçekteştikten sonra ortamın ışık şartları 16 saat (aydınlık)/8 saat (karanlık) fotoperiyota göre ayarlanmıştır.

Anatomik kesitler, bir haftalık fidelerin kök boğazından, mürver özü arasında jilet yardımıyla elde alınmış ve inceleme ortamı olarak % 50' lik sıvı jelatin kullanılmıştır.

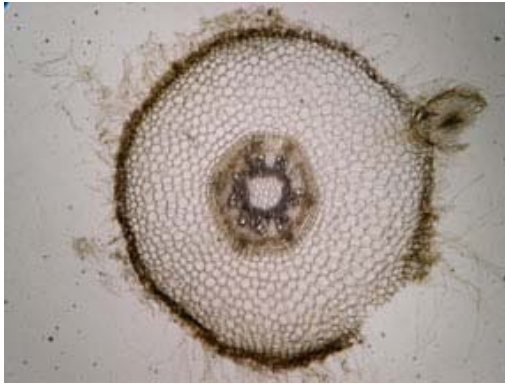
Ksilem kollarının ve lateral köklerin ölçümleri 50 adet kesitte yapılarak ortalama alınmak suretiyle saptanmıştır.

Anatomik kesitlerin fotoğrafları Olympus Bx50 marka fotoğraf makinesinde 16 büyütme uygulanarak, yanal köklerin morfolojik görüntüsü ise Olympus SZ-PT*50 ile 8 büyütme sonucunda çekilmıştir.

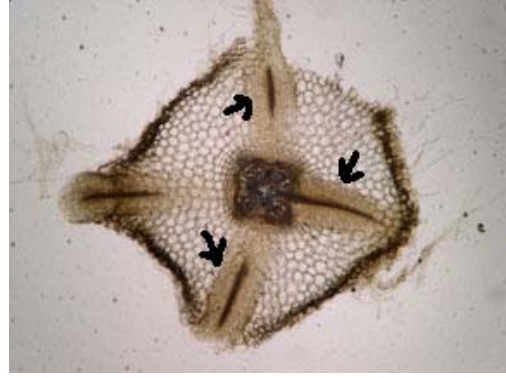
Araştırma Bulguları

Kontrol (a) ve uygulama (b) ortamlarına ekilen tohumların tümünün 72 saatin sonunda çimlendiği görülmüştür.

7. günün sonunda gelişen fidelerin kök boğazının toprak yüzeyinin 1 mm lik kısmından alınan enine kesitlerde ksilem kolu sayısında farklılıklar gözlenmiştir. Buna göre kontrol ortamında (a) yetişen bitkilerin köklerinde ksilem kolu sayısı $8\pm 0,01$ olarak kaydedilirken (Şekil 1a), uygulama (b) ortamında yetişen fide köklerinde bu sayı $4\pm 0,01$ olarak belirlenmiştir (Şekil 1b). Lateral köklerin sayısı ise $6\pm 0,01$ olarak saptanmıştır.

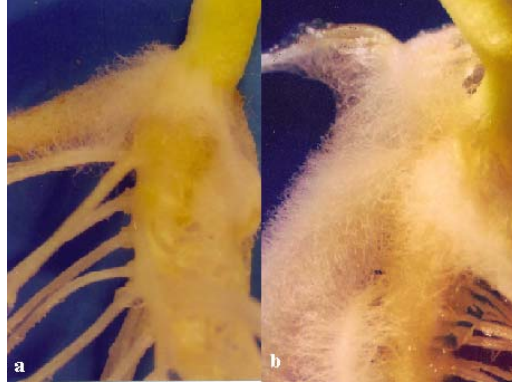


a



b

Şekil 1. Kontrol ortamında (a) ve bor fazlalığı (b) içeren ortamlarda yetişen köklerin anatomik kesitleri. Oklar lateral köklere işaret etmektedir. 1 cm = 20 μ .



Şekil 2. Fidelerdeki lateral kök oluşumu, a: kontrol ortamında, b: bor fazlalığı uygulanmış ortam (24 mg/l).

Tartışma ve Sonuç

Kökün vasküler silindirindeki primer vasküler farklılaşma ksilem ve floemin radyal diziliş kalıbıyla karakterize edilmektedir. Primer vasküler dokular ve lateral köklerin orijinlendiği perisikl polar IAA taşınımının ana yollarıdır. Çiçekli bitkilerde monokotil ve dikotil olmak üzere iki ana vasküler doku morfolojisi vardır. Vasküler dokuyu oluşturan ksilem arkları vasküler silindirin periferinde dizilirler ve silindirin merkezi monokotillerde parankimatiktir veya dikotillerde olduğu gibi silindirin merkezi silindirin periferine ışınlar şeklinde uzanan ksilem kollarıyla kaplanmıştır. Her iki durumda da floem kolları vasküler silindirin periferinde ayrı bir şekilde yer alırlar (Raven, 2005).

Sitokininler IAA'nın varlığında vasküler dokudaki hücre bölünmesini çoğaltarak (Roberts ve ark., 1988), vasküler farklılaşmayı arttırmaktadırlar (Aloni, 1995). Bu nedenle sitokininler doku kültüründe ksilem kollarının sayısının artışı sınırlayan ve kontrol eden bir faktördür (Saks ve ark., 1984) ve ksilem kollarının sayısı vasküler silindirin çevresi arasında doğrusal bir ilişki vardır (Sachs, 1981; Fahn, 1990). Muhtemelen öksin vasküler silindirin çapını kök apikal meristemini büyüklüğünü düzenleyerek ayarlamaktadır (Torrey, 1957). Aloni (2004) de perisikldeki IAA akışının kök vasküler silindirindeki primer damarların genişliğini etkilediğini belirtmiştir. Deneme sonuçlarımızda ayçiçeği bitkisi kökünde, ksilem kolları sayısında bor fazlalığı etkisiyle görülen indirgenmenin, bor etkisiyle IAA'nın (Akçam-Oluk ve Demiray, 2005) ve sitokininlerin artması neticesinde gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Kök sisteminin mimari yapısı çevresel ve hormonal uyartılarla şekillenmektedir (Lopez-Bucio ve ark., 2003). Kök yapısı yoğun içsel ve dışsal sinyallerin bileşiminden etkilenecek, yoğun olarak lateral kök oluşturduklarında aşırı gelişimsel plastisite göstermektedir (Malamy, 2005). Sitokininler, kök şapkasından orijinlenerek, lateral kök belirimine ket vurarak esas itibarıyla kökün vasküler silindiri boyunca yukarıya doğru hareket etmektedirler (Aloni ve ark., 2005). Farklılaşan protoksilem hücrelerinden lokal olarak üretilen etilen lateral kök belirimini yönünü tayin etmektedir. Lateral kök beliriminin ilk safhası, farklılaşan protoksilem elementlerinden, bu elementleri indükleyen yükselmiş IAA konsantrasyonlarının sonucunda etilen üretimiyle gerçekleşmektedir (Aloni ve ark., 2006).

Absisik asitin (ABA) de lateral kök başlangıcını etkilediği bildirilmektedir (Hookert ve Thorpe, 1998). Bor elementi fazlalığında havuç kök kalluslarında ABA miktarının arttığı Demiray ve Dereboylu'nun (2006) çalışmasında bildirilmiştir. Öksinle indüklenmiş ABA lateral kök oluşumunda önemli rol oynamaktadır (De Smet ve ark., 2006). Yine de çok hücreli organizmada, tek bir hormonal sinyale tepkinin hücre tiplerinin hassaslık ve tepki modu farklılıklarının bir karışımı olacağı akıldan çıkmamalıdır. ABA için de durum böyledir (Liang ve Harris, 2005).

Dikotil grupta yer alan ve bor elementine toleransı olan ayçiçeği bitkisi kazık kök yapısına sahip olup, kökte iletim demetleri ışınal şekilde dizilmiş olarak bulunmaktadır. Dikotil bitkilerde iletim dokusunda ksilem kolları sayısının (ark) 4-8 arasında olduğu bilinmektedir (Anonymous, 2005). Sonuçlarımıza göre, ortamın bor seviyesi arttırıldığında ayçiçeği bitkisinin köklerindeki ksilem kolu sayısında 8' den 4' e bir indirgenme meydana gelirken, lateral kök oluşumunda ise bir oldukça belirgin artış gerçekleşmektedir. Kök kültürlerinde yüksek bor konsantrasyonlu ortamlarda yetiştirilen hassas genotiplerin, toleranslı olanlara göre daha kısa kök eksen ve daha az lateral kök oluşturdukları bildirilmektedir (Huang ve Graham, 1990). Bu durum bizim sonuçlarımızla da paralellik göstermektedir.

Bor fazlalığında mezofil hücrelerinin bazıları hücre düzensizlikleri ve büzülmeler göstererek, intersellüler alanların genişlemesine ve komşu hücrelerde sınırlı hipertropi ve hiperplasiya yol açmaktadır (Fink, 1999). Kökte bu intersellüler alanlar, özellikle korteks bölgesinde kısmen mineral solüsyonla dolarak su ve besin alınımına yönlendirilebilmektedir (Canny ve Huang, 1993; Canny, 1995b). Daha büyük intersellüler boşluklar yeni ortaya çıkan lateral

köklerin ve içsel gelişen adventif köklerin, örneğin kesmelerde, oluşmasında rol almaktadırlar (Smith, 1936). Ayçiçeği köklerinde lateral köklerin oluşmasının bor fazlalığı nedeniyle bu yolla gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Güney-doğu Avustralya'nın alkali topraklarına eşdeğer seviyelerde bor ve tuz uygulamalarında kök kuru ağırlığının azaldığı 9 üründe tespit edilerek, yonca ve hindiba'da kök derinliğindeki azalışlara lateral kök büyümesini arttırarak cevap vermiştir (Davies ve ark., 2004).

Bitkilerde trake oluşumuyla, büyüme stimülatörlerinden IAA'nın sıkı bir ilişki içinde olduğu bilinen bir olgudur (Moreau ve ark., 2005). Diğer taraftan, ortamdaki bor miktarının IAA oksidazın sentezini engelleyerek IAA oluşumunu arttırdığı da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Robertson ve Laughman, 1974; Akçam-Oluk ve Demiray, 2005). Bu çalışmayla ilk kez saptanan trake sayısı azalmasının, ortamdaki borun artışına paralel olarak IAA miktarının da artmasıyla gerçekleştiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Çalışmamızda ayçiçeği Sambro No: 5 kültüvarında görülen lateral kök büyümesi ve kökün vasküler dokusundaki ksilem kollarının sayısında görülen indirgenme yukarıdaki araştırmaların ışığında incelendiğinde, farklı bor konsantrasyonları ve farklı kültüvarlarda da denemeleri yürütmeyi düşündürmektedir.

Özet

Çalışmamızda, bitkilerin mikro element olarak gereksinim duydukları, Türkiye için stratejik bir önemi olan borun ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv. sambro No.5) bitkisinin kök gelişimine etkileri araştırılmıştır.

Ayçiçeği tohumları in vitro koşullarda çimlendirilmiştir. Besin ortamı olarak Murashige-Skoog reçetesi kullanılmıştır. Ortamın bor miktarı borik asit miktarının normal reçete miktarının 4 katı fazla olarak (24,8g/l) değiştirilmesiyle ayarlanmıştır. Anatomik ve morfolojik çalışmaların sonucunda, bor fazlalığı kökün vasküler silindirindeki ksilem kolu (ark) sayısında 8 den 4'e bir azalmaya yol açarken lateral kök oluşumunda da bir artışa neden olmuştur.

Anahtar sözcükler: Ayçiçeği, bor, ksilem kolları.

Kaynaklar

- Akçam-Oluk, E., Demiray, H. 2004. Bor elementinin Sambro No:3 ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşidinin büyümesi üzerine etkileri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 41(1):181-190.
- Aloni, R. 1995. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: Davies P. J. ed. Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht: Kluwer, 531-546.

- Aloni, R. 2004. The induction of vascular tissue by auxin. In Davies P. J. ed. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht: Kluwer, 471-492.
- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., Dreecher, E., Ullrich, C. E. 2005. Root-synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany* 56: 1535-1544.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* 97: 883-893.
- Anonymous, 2005. Stem & Root Anatomy. <http://waynesword.palomar.edu/trjune99.htm>.
- Canny, M.J. 1995b. Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 215-236.
- Canny, M.J., Huang, C.X. 1993. What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscope. *Physiol.Plant.* 87, 561-568.
- Davies, S., Nuttall, J., Armstrong, R. D., Peoples, M. 2004. Assessing the impact of high soil boron and salinity on the root growth of potential primer plant species. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.
- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D., Beckman, T. 2006. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* vol. 11 No 9, 434-439.
- Demiray, H., Eşiz-Dereboylu, A. 2006. The effects of excess boron with niacin on *Daucus carota* L. (carrot) root callus. *Acta Biologica Hungarica* 57(1), 105-114.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy*. 4th edn., Oxford: Pergamon.
- Fink, S. 1999. *Pathological and Regenerative Plant Anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Hookert, S., Thorpe, T. A. 1998. Effects of fluridone and abscisic acid on lateral root initiation and root elongation of excised tomato roots cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol.52, No:3, 199-203.
- Huang, C., Graham, R.D. 1990. Resistance of wheat genotypes to boron toxicity expressed at the cellular level. *Plant and Soil.* 126, 295-300.
- Liang, Y., Harris, J. M. 2005. Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes. *American Journal of Botany* 92 (10): 1675-1683.
- Lopez-Bucio, J., Cruz- Ramirez, A., Herrera,- Estella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 280-287.
- Malamy, J. E. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment* 28: 67-77.
- Moreau, C., Aksenoy, N., Lorento, M.G., Segerman, B., Funk, C., Nilsson, P., Jansson, S., Touminen, H. 2005. A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of *Populus* trees. *Genome Biology*, 6(4): 67-73.
- Murashige T., Scoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Oertli, J., Kohl, H.C. 1961. Some considerations about the tolerance of various plant species to excessive supplies of boron. *Soil. Sci.* 92, 243-247.

- Raven, J. A. 1980. Short and long – distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.*, 84, 231-249.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 2005. *Biology of Plants*. 7th edn., New York: Freeman.
- Roberts, L. W., Gahan, P. B., Aloni, R. 1988. *Vascular differentiation and plant growth regulators*. Berlin, Springer.
- Robertson, G. A., Loughman, B. C. 1974. Response to boron deficiency: A comparison with responses produced by chemical methods of retarding root elongation. *New Phytol.*, 73: 821-832.
- Sachs, T. 1981. The control of patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research*, 9: 151-262.
- Saks, Y., Feigenbaum, P., Aloni, R. 1984. Regulatory effect of cytokinin on secondary xylem fiber formation in an in vivo system. *Plant Physiology*, 76: 638-642.
- Smith, A. I. 1936. Adventitious roots in stem cuttings of *Begonia maculata* and *B. semperflorens*. *Amer. J. Bot.* 23, 511-515.
- Torrey, J. G. 1957. Auxin control of vascular pattern formation in regenerating pea root meristems grown in vitro. *American Journal of Botany*, 44: 859-870.