Studia embriologiczne nad poliploidalnymi formami *Trifolium repens* L.

Embryological studies on polyploid forms of *Trifolium repens*

K. BIJOK, M. GÓRAL, ST. GÓRAL

WSTĘP

Poliploidy *Trifolium repens* L., uzyskane drogą kolchicynowania, zachowują się podobnie jak kolchiploidy innych gatunków rodzaju *Trifolium*. Najczęściej obserwuje się tutaj gigantyzm określonych organów, jak na przykład zwiększone w stosunku do formy wyjściowej kwiaty, liście, cwocostany i nasiona. Następuje to najczęściej skutkiem zwiększenia rozmiarów pojedynczych komórek. Prawdopodobnie ta pozwala na wykorzystanie pomiarów komórek, np. aparatów szparkowych, oraz dojrziałych ziarn pyłku do wstępnej identyfikacji poliploidów.

Obok zmian morfologicznych i fizjologicznych, poliploidyzacja wywiera znaczny wpływ na stosunki genetyczne i płodność kolchiploidów. Badania Desseraux (1951), Hertzscha (1954) i Mackiewicza (1958, 1963) wykazały, że współczynnik rozmnażania koniczyn zależy w znacznym stopniu od liczby zalążków w strąku i ich płodności. Na podstawie wcześniejszych prac (Bijok, Góral, Góral 1968) dotyczących poliploidów *T. repens* L. uzyskanych z ekotypów pochodzących ze stanowisk naturalnych północnych rejonów Polski stwierdzono, podobnie jak w badaniach innych autorów, zmniejszenie współczynnika rozmnażania u tych form. Poszukiwanie przyczyn zmniejszonej płodności kolchiploidów *T. repens* w porównaniu do materiału wyjściowego od strony embriologicznej było przedmiotem niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Do badań embriologicznych posłużyły ekotypy *T. repens* zebrane ze stanowisk naturalnych w okolicy Olsztyna (wieś Wadąg, Słupy, Jaroty i Leśnictwo Stary Dwór) oraz ich formy poliploidalne o liczbie $2n = 64$ chromosomów uzyskane drogą kolchicynowania.

Materiał w postaci pączków kwiatowych i kwiatów o różnym stopniu rozwoju zebrano w 1967 roku z poletek doświadczalnych Katedry.

Materiał utrwalony 50% roztworem utrwalacza Nawaszyna zatopiono w parafinie przy 52°C i krojono na mikrotomie na skrawki o grubości $15\text{ }\mu$. Preparaty barwiono 1% fioletem gencjanowym, różnicując je roztworem fenolu w ksylenie (1:3).

Rysunki wykonano aparatem Zeissa spod mikroskopu NfpK. przy użyciu obiektów $90\times$, $40\times$ w połączeniu z okulem $20\times$ i $12\times$ Zeissa. Powiększenie rysunków podano przy odnośnych figurach.

Liczby chromosomów

Liczbę chromosomów obu badanych form ustalono w metafazach somatycznych merystemów stożków wzrostu korzeni $2n = 32$ u formy tetraploidalnej ze stanowisk naturalnych północnej Polski i $2n = 64$ chromosomów u formy oktoploidalnej uzyskanej działaniem wodnego roztworu kolchicyny (Bijok, Góral, Góral 1968).

Wyniki powyższe potwierdzono również w obserwacjach nad mejozą w komórkach macierzystych pyłku (rys. 1, 2).

Rys. 1. Biwalenty z metafazy pierwszego podziału meiotycznego komórek macierzystych pyłku formy tetraploidalnej *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$), ($\times 2400$)

Fig. 1. Bivalents from first metaphase in P.M.C.'s tetraploid form of *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$), ($\times 2400$)

Ryc. 2. Biwalenty z metafazy pierwszego podziału meiotycznego komórek macierzystych pyłku formy oktoploidalnej *Trifolium repens* ($n=32$, $2n=64$), ($\times 2400$)

Fig. 2. Bivalents from first metaphase in P.M.C.'s octoploid form of *Trifolium repens* ($n=32$, $2n=64$), ($\times 2400$)

U obu form zarówno tetraploidalnej ($n = 16$), jak i oktoploidalnej ($n = 32$) chromosomy występują w mejozie wyłącznie w postaci biwalentów (rys. 1, 2, 3, 5, 17, 19). Nie obserwowano ani w diakinezie, ani w pierwszej metafazie podziału mejotycznego u formy tetraploidalnej tetrawalentów, a u formy oktoploidalnej oktowalentów. Należy stwierdzić, że w stadium pierwszej metafazy podziału mejotycznego obserwowano pewne różnice w wyglądzie biwalentów u obu badanych form *T. repens* (rys. 1, 2).

Obserwacje nad rozwojem pyłku u formy tetra-
i oktoploidalnej
Trifolium repens

A. Topografia pylnika

Na przekroju poprzecznym w młodym stadium rozwoju pylnika stwierdzono cztery komory pylnikowe, których wnętrze wypełniają komórki macierzyste pyłku. Przylegają one w tym okresie ściśle do siebie, a ich liczba na przekroju poprzecznym waha się w granicach od 4 do 5. W ścianie pylnika można było wtedy wyróżnić cztery warstwy, a mianowicie: skórkę, warstwę włóknistą, warstwę zanikającą i wewnętrzną warstwę wyścielającą — tapetum.

B. Tapetum

W stadiach premejotycznych obydwu cytotypów *T. repens* warstwę tapetum tworzyły komórki jednojądrowe.

U badanych form nie obserwowano podziałów jąder w komórkach tapetum, nie zlewały się one, ani też nie zachodziło w nich zwiększenie liczby chromosomów na drodze endomitozy.

Jądra komórek tapetum u obydwu badanych form były diploidalne. Na skutek wzrostu pylnika, komórki tapetum wydłużały się i przyjmowały kształt wrzecionowaty. W ich cytoplazmie początkowo pojawiały się drobne wodniczki, które później zlewały się i tworzyły jedną dużą wodniczkę. W czasie dojrzewania ziarn pyłku obserwowano u obu badanych form postępujący proces degeneracji komórek warstwy tapetum. Objawiło się to słabą barwliwością jąder, zanikiem błon komórkowych i w końcowym stadium degeneracją komórek.

C. Mikrosporogeneza

U badanych form *T. repens* w obrębie jednej komory pylnikowej wszystkie komórki macierzyste pyłku znajdowały się w tym samym stadium podziałowym.

Komórki macierzyste pyłku różniły się bardzo wyraźnie od otaczających je komórek warstwy tapetum. W miarę wzrostu pylnika na dłu-

gość, komórki macierzyste pyłku traciły swoją uprzednią zwartość, zaokrąślały się i pojawiały się między nimi mniejsze lub większe przestwory międzykomórkowe. W stadium diakinezy były one luźno ułożone w komorach pylnikowych.

Dokładne badania podziałów mejotycznych przeprowadzono od stadium diakinezy komórek macierzystych pyłku.

U *T. repens* ze stanowisk naturalnych, formy tetraploidalnej w stadium diakinezy daje się wyróżnić 16 biwalentów (rys. 3). Obserwowano zawsze pewne stałe konfiguracje pomiędzy koniugującymi chromosomami.

U sztucznych oktoploidów stwierdzono również tylko biwalenty, jednakże w ilości podwojonej, czyli w liczbie 32 par (rys. 17).

W metafazie I podziału mejotycznego podobnie jak w diakinezie u formy tetraploidalnej *T. repens* obserwowano 16, a u formy oktoploidalnej 32 pary chromosomów (rys. 4, 5, 18, 19). Metafazowe płytki chromosomowe leżały najczęściej w środku komórki macierzystej pyłku, wyjątkowo zepchnięte były ku jej obwodowi (rys. 4, 18). W tym stadium po normalnej kongresji chromosomów, można było zawsze obserwować wyraźnie wykształcone dwubiegunowe wrzeciono kariologiczne (rys. 4, 18).

Stadium anafazy I podziału mejotycznego obu badanych form przebiegało normalnie, bez jakichkolwiek zaburzeń. Rozchodzenie się chromosomów na bieguny było wyraźnie zsynchronizowane. Pomiedzy grupami chromosomów kierującymi się na bieguny obserwowano dość wyraźnie wykształcony fragmoplast, który utrzymywał się do okresu powstania dwóch jąder potomnych, po czym zanikał (rys. 6, 7, 20, 21).

W metafazie II podziału mejotycznego obie płytki chromosomowe i oba wrzeciona kariologiczne zarówno u formy tetra- jak i oktoploidalnej *T. repens* układały się najczęściej równolegle, rzadko prostopadle w stosunku do siebie (rys. 8, 22).

W stadium anafazy II podziału mejotycznego u obu badanych form, podobnie jak w anafazie I podziału mejotycznego, obserwowano również zsynchronizowane rozchodzenie się chromosomów na bieguny. Również i tutaj pomiędzy rozchodzącymi się chromosomami widoczne były wyraźnie wykształcone fragmoplasty (rys. 9, 23).

W stadium telofazy II podziału mejotycznego komórki macierzyste pyłku posiadały cztery jądra. Pomiedzy nimi widoczne było sześć dobrze widocznych fragmoplastów (rys. 10, 24). W starszych stadiach rozwoju obserwowano w cytoplazmie komórek macierzystych sześć zarysowujących się bruzd, które w miarę jak się pogłębiały, powodowały powstanie czterech protoplastów. Protoplasty te, początkowo powiązane mostkami, później jednak ulegały rozerwaniu, co powodowało powstanie czterech komórek — tetrady mikrospor. Każda z komórek tetrady posia-

Ryc. 3—16. Rozwój pyłku u tetraploidalnej formy *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$)

3 — diakineza, 4 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego, 5 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego — widoczna z góry, 6, 7 — anafaza i telofaza pierwszego podziału mejotycznego, 8 — metafaza drugiego podziału mejotycznego, 9, 10 — anafaza i telofaza drugiego podziału mejotycznego, 11 — tetrada mikrospor, 12, 13 — pierwotne ziarno pyłku, 14 — podział mitotyczny w pierwotnym ziarnie pyłku, 15 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i jądrem generatywnym w podziale (w stadium metafazy), 16 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 2400$)

Fig. 3—16. Development of pollen in tetraploid form of *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$)

3 — diakinesis, 4 — first metaphase in P.M.C.'s., 5 — first metaphase in P.M.C.'s., — polar view, 6, 7 — first anaphase and telophase in P.M.C.'s., 8 — second metaphase in P.M.C.'s., 9, 10 — second anaphase and telophase in P.M.C.'s., 11 — formation of microspore tetrads, 12, 13 — original pollen grain, 14 — nucleus of pollen grain in metaphase stage, 15 — pollen grain with vegetative nucleus and generative nucleus in metaphase stage, 16 — pollen grain with vegetative nucleus and two sperm nuclei ($\times 2400$)

Ryc. 17—30.

dała duże jądro komórkowe o luźnej strukturze (rys. 11, 25). Występował tutaj podział równoczesny, charakterystyczny dla *Dicotyledones*. Powstałe pierwotne ziarna pyłku uwalniały się następnie z błony komórek macierzystych pyłku.

D. Rozwój pierwotnych ziarn pyłku

Pierwotne ziarna pyłku początkowo otoczone były pojedynczą błoną — intyną (rys. 12, 26). W dalszym ich rozwoju wykształcała się druga błona — egzyna, która, przypuszczalnie powstawała przy współudziale komórek tapetum (Maheshwari 1950) (rys. 13—16, 27—30). W dojrziałych ziarnach pyłku, w egzynie, zarówno u formy tetraploidalnej, jak i oktoploidalnej obserwowano sięgające do intyny, na ogół tylko trzy zagłębienia — pory (rys. 16, 30).

W starszych, pierwotnych ziarnach pyłku, u obu badanych form, wykształcała się centralnie umieszczona wodniczka, która duże o luźnej strukturze jądro, spychała ku błonie komórkowej (rys. 13, 14, 27, 28).

Po pierwszej mitozie ziarna pyłku posiadały dwa jądra: wegetatywne i generatywne. To ostatnie otoczone było cienką warstwą własnej cytoplazmy, o gęściejszej konsystencji (rys. 14, 15, 28, 29).

Po podziale mitotycznym jądra generatywnego, ziarna pyłku w badanym materiale były trójjądrowe; posiadały jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe. Te ostatnie, podobnie jak jądro generatywne otaczała również cienka warstwa własnej cytoplazmy (rys. 16, 30).

W tym stadium zachodziło pęknięcie pylników i wysypywanie się pyłku.

Ryc. 17—30. Rozwój pyłku u eksperymentalnej oktoploidalnej formy *Trifolium repens* ($n=32$, $2n=64$)

17 — diakineza, 18 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego, 19 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego — widoczna z góry, 20, 21 — anafaza i telofaza pierwszego podziału mejotycznego, 22 — metafaza drugiego podziału mejotycznego, 23, 24 — anafaza i telofaza drugiego podziału mejotycznego, 25 — tetrada mikrospor, 26, 27 — pierwotne ziarno pyłku, 28 — podział mitotyczny w pierwotnym ziarnie pyłku, 29 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i jądrem generatywnym w podziale (w stadium metafazy), 30 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 2400$)

Fig. 17—30. Development of pollen in experimental octoploid form of *Trifolium repens* ($n = 32$, $2n = 64$)

17 — diakinesis, 18 — first metaphase in P.M.C's., 19 — first metaphase in P.M.C's. — polar view, 20, 21 — first anaphase and telophase in P.M.C's., 22 — second metaphase in P.M.C's., 23, 24 — second anaphase and telophase P.M.C's., 25 — formation of microspore tetrads, 26, 27 — original pollen grain, 28 — nucleus of pollen grain in metaphase stage, 29 — pollen grain with vegetative nucleus and generative nucleus in metaphase stage, 30 — pollen grain with vegetative nucleus and two sperm nuclei ($\times 2400$)

Ryc. 31—43. Rozwój woreczka zalążkowego u formy tetraploidalnej *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$)

31 — archospor wielokomórkowy, 32 — tetrady makrospor, 33 — komórki macierzyste woreczków zalążkowych z zanikającymi makrosporami od strony okienka, 34 — jednojądrowy woreczek zalążkowy, 35 — jądro woreczka zalążkowego w podziale (w stadium anafazy), 36 — dwujądrowy woreczek zalążkowy, 37 — czterojądrowy woreczek zalążkowy — jądra chalazalne w stadium telofazy, 38 — czterojądrowy woreczek zalążkowy, 39 — woreczek zalążkowy z dwoma jądrami oraz trzema w stadium ana- i metafazy, 40 — ośmiojądrowy woreczek zalążkowy, 41 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i jądrami biegunowymi, 42 — chalazalna część woreczka zalążkowego z trzema antypodami, 43 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego ($\times 700$)

Fig. 31—43. Development of embryo sac in tetraploid form of *Trifolium repens* L. ($n=16$, $2n=32$)

31 — multicellular archespor, 32 — tetrads of megaspores, 33 — mononucleate embryo sacs, 34 — mononucleate embryo sac, 35 — nucleus of mononucleate embryo sac in telophase stage, 36 — binucleate embryo sac, 37 — tetranucleate embryo sac with one nucleus in telophase stage, 38 — tetranucleate embryo sac, 39 — mitosis in three nuclei, 40 — octonucleate embryo sac, 41 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and polar nuclei, 42 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells, 43 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary embryo sac nucleus ($\times 700$)

Wymiary ziarn pyłku były następujące: u formy tetraploidalnej średnia wielkość stu badanych ziarn wynosi 11,25 mikronów, a u formy oktoploidalnej 15,43 mikronów.

Obserwacje nad rozwojem zalążka u formy tetra- i oktoploidalnej
Trifolium repens

A. Topografia zalążka

Zalążek w rodzaju *Trifolium* jest amfitropowy, cienkośrodkowy o podwójnym integumencie, z których wewnętrzny posiada tylko dwie warstwy komórek.

Liczba zalążków w zalążni u obu badanych form mieści się w granicach od 4 do 7.

Ośrodek stanowi jedna warstwa komórek, które tworzą jego epidermę. Komórki te we wczesnym rozwoju zalążka były na przekroju podłużnym prawie prostokątne, wypełnione cytoplazmą z wyraźnie barwiącym się jądrem komórkowym. Degeneracja komórek epidermy ośrodka następowała od stadium ośmiojądrowego woreczka zalążkowego. W stadium tym wymienione komórki ulegały wydłużeniu, spłaszczeniu, a całkowita ich degeneracja zachodziła w stadium dojrzałego woreczka zalążkowego

B. Archespor

Archespor zarówno u tetra-, jak i oktoploidalnej formy *T. repens* był wielokomórkowy (rys. 31, 44, 45). Komórki archesporu obu badanych form, w toku zachodzących w nich podziałów mejotycznych, rozrastały się w kierunku podłużnej osi zalążka i częściowo wciskały pomiędzy komórki chalazy.

C. Makrosporigeneza

Komórki archesporu formy tetra- i oktoploidalnej *T. repens*, kształtu wydłużonego, z dużymi jądrami o luźnej strukturze, przylegały ściśle do siebie (rys. 31, 44). Przekształcały się one bezpośrednio w komórki macierzyste makrospor bez oddzielania komórek przykrywkowych. W czasie zachodzących w nich podziałów mejotycznych traciły poprzednią zwartość ułożenia (rys. 45). W tym czasie komórki macierzyste makrospor w obrębie jednego zalążka znajdowały się w różnych stadiach podziałów mejotycznych (rys. 32, 45, 46). Można było w tym czasie obserwować komórki w stadium diakinezy, metafazy pierwszego podziału mejotycznego, jak i w stadium diady, czy tetrady (rys. 32, 45—47). Po pierwszym i drugim podziale mejotycznym, zachodzącym we wszystkich komórkach macierzystych makrospor, obserwowano wykształcone tetrady makrospor (rys. 32, 47). Tetrady te były ułożone mniej lub bardziej linio-wo (rys. 32, 47).

Ryc. 44—45. Rozwój woreczka zalążkowego u eksperymentalnej oktoploidalnej formy *Trifolium repens* ($n=32$, $2n=64$)

44 — archespor, 45 — podziały meiotyczne w komórkach archesporialnych, 46 — diady, 47 — tetrady, 48 — komórki macierzyste woreczków zalążkowych z zanikającymi makrosporami od strony okienka, 49 — jednojądrowy woreczek zalążkowy, 50 — dwujądrowy woreczek zalążkowy, 51 — czterojądrowy woreczek zalążkowy, 52 — ośmiojądrowy woreczek zalążkowy, 53 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnymi jądrami biegunowymi, 54 — chalazalna część woreczka zalążkowego z trzema antypodami, 55 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego ($\times 700$)

Fig. 44—55. Development of embryo sac in experimental octoploid of *Trifolium repens* ($n=32$, $2n=64$)

44 — multicellular archespor, 45 — meiotic divisions in archesporial cells, 46 — dyad cells, 47 — tetrad of megaspores, 48 — mononucleate embryo sacs, 49 — mononucleate embryo sac, 50 — binucleate embryo sac, 51 — trinucleate embryo sac, 52 — octonucleate embryo sac, 53 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and polar nuclei, 54 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells, 55 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary embryo sac nucleus ($\times 700$)

D. Rozwój woreczka zalążkowego

W dalszym stadium zalążka obserwowano tetrady makrospor, z których po trzy makrospory od strony okienka ulegały degeneracji, czwarte natomiast makrospory chalazalne tworzyły komórki macierzyste woreczków zalążkowych (rys. 33, 48).

W rozwoju woreczka zalążkowego brała udział tylko jedna makrospora chalazalna tetrady makrospor, leżąca najczęściej w pobliżu okienka, inne natomiast były spychane w kierunku chalazy, czy też na boki ośrodką, gdzie degenerowały. Szczątki ich można było często obserwować w postaci komórek nieco wydłużonych o silnie pomarszczonych błonach względnie w postaci ciemno barwiącej się masy (rys. 33—35, 48—50).

Podziały jąder w woreczku zalążkowym przebiegały synchronicznie, jednak w części chalazalnej często ulegały pewnemu opóźnieniu. Przedstawiony na rysunku 37, 39 woreczek zalążkowy wykazuje, że jądra od strony okienka wyprzedzają w podziałach jądra leżące bliżej chalazy.

Ryc. 56. Wykresy średnicy jąder komórkowych periblemu w mikronach
1 — forma tetraploidalna *T. repens* L. (2n=32), 2 — oktoploid eksperymentalny *T. repens*

Fig. 56. Graphs of cell nuclei periblem in microns

1 — tetraploid form of *T. repens* L. (2n=32) 2 — experimental octoploid of *T. repens* (2n=64)

Ryc. 57. Wykresy średnicy jąder komórkowych dermatogenu w mikronach
1 — forma tetraploidalna *T. repens* L. (2n=32), 2 — oktoploid eksperymentalny *T. repens*

Fig. 57. Graphs of cell nuclei diameter in dermatogen, in microns
1 — tetraploid form of *T. repens* L. (2n=32) 2 — experimental octoploid of *T. repens* (2n=64)

Szczególną uwagę zwraca rozmieszczenie jąder parami, pozwala to wnosić, że zbliżone do siebie jądra są jądrami siostrzanymi (rys. 37—40, 51, 52).

Makrospora, która staje się komórką macierzystą woreczka zalążkowego dość silnie się wydłuża (rys. 34, 49). W różnych stadiach rozwoju woreczka zalążkowego, obserwowano u badanych form *Trifolium* woreczki zalążkowe dwu-, cztero- i ośmiojądrowe (rys. 35—40, 50—52). W woreczku dwu- i czterojądrowym pomiędzy jądrami od strony okienka a jądrami od strony chalazy obserwowano silnie wykształconą wodniczkę (rys. 36—38, 50—51).

Woreczek zalążkowy u obu badanych form *Trifolium* jest ośmiojądrowy typu monosporialnego (rys. 40—43, 52—55).

Ryc. 58. Wykresy długości aparatów szparkowych w mikronach

1 — forma tetrapoidalna *T. repens* L. ($2n=32$), 2 — oktoploid eksperymentalny *T. repens* L. ($2n=64$)

Fig. 58. Graphs of stomatal length, in microns

1 — tetraploid form of *T. repens* L. ($2n=32$) 2 — experimental octoploid of *T. repens* ($2n=64$)

Ryc. 59. Wykresy średnicy ziarn pyłku w mikronach

1 — forma tetrapoidalna *T. repens* L. ($2n=32$), 2 — oktoploid eksperymentalny *T. repens* L. ($2n=64$)

Fig. 59. Graphs of pollen grain diameter, in microns

1 — tetraploid form of *T. repens* L. ($2n=32$), 2 — experimental octoploid of *T. repens* ($2n=64$)

E. Budowa dojrzałego woreczka zalążkowego

Dojrzały woreczek zalążkowy zarówno u formy tetra-, jak i oktoploidalnej *T. repens* posiada typową budowę, a mianowicie: aparat jajowy składający się z komórki jajowej i dwóch synergid, duże wtórne jądro woreczka zalążkowego powstałe z dwóch jąder biegunowych i trzy antypody (rys. 41—43, 53—55).

Komórka jajowa leży bezpośrednio pod okienkiem i swą rozszerzoną częścią sięga do wnętrza woreczka zalążkowego. Wnętrze komórki jajowej wypełnia ziarnista cytoplazma, w której mieści się duże jądro komórkowe o bardzo luźnej strukturze. W części wydłużonej i zwężonej w kierunku okienka występuje w cytoplazmie wodniczka.

Synergidy stanowią komórki dość krótkie, zwężoną częścią skierowane w kierunku okienka a rozszerzoną w stronę wnętrza woreczka zalążkowego. Jądra komórkowe synergid zajmują w cytoplazmie górną część komórki od strony okienka, a w dolnej części występuje wodniczka (rys. 41, 43, 53, 55).

Jądra biegunowe występują mniej więcej w jednej trzeciej woreczka zalążkowego. Są dość duże i posiadają zwykle luźną strukturę (rys. 41, 53). Ich połączenie się we wtórne jądro woreczka zalążkowego następuje dość szybko. Wtórne jądro woreczka zalążkowego posiada bardzo luźną strukturę i silnie barwiące się dwa jąderka; przylega prawie bezpośrednio do aparatu jajowego (rys. 43, 55).

Antypody u obu badanych form *T. repens* występują w chalazalnej części woreczka zalążkowego w liczbie trzech komórek (rys. 42, 54). Antypody zawierają cytoplazmę z luźno ułożonymi w niej wodniczkami.

Należy wyraźnie podkreślić, że zarówno u formy tetraploidalnej, jak i formy oktoploidalnej woreczki zalążkowe wykształcają się we wszystkich zalążkach.

Analiza niektórych cech anatomicznych u formy tetra-
i oktoploidalnej *T. repens*

Na wykresach 56—59 zestawiono pomiary średnic jąder komórkowych dermatogenu i periblemu, długości aparatów szparkowych w liściach oraz pomiary średnic ziarn pyłku u formy tetraploidalnej ze stanowisk naturalnych, jak i sztucznych oktoploidów *T. repens*.

Analiza zestawionych na wykresach cech anatomicznych oraz poprzednio przeprowadzone badania morfologiczne (Bjork, Góral, Góral 1968) wykazują zgodność z ogólnie przyjętymi zasadami, co do różnic w cechach anatomiczno-morfologicznych form poliploidalnych, w stosunku do form wyjściowych.

DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy było znalezienie przyczyn zmniejszonej płodności kolchiploidów *Trifolium repens* w porównaniu z materiałem wyjściowym od strony badań embriologicznych.

W toku przeprowadzonych badań nad mejozą w komórkach macierzystych pyłku zostały potwierdzone liczby $n = 16$, $2n = 32$ u formy tetraploidalnej (rys. 1) i $n = 32$, $2n = 64$ chromosomów u formy oktoploidalnej *T. repens*. (rys. 2) (Bijok, Góral, Góral 1968).

Zarówno u formy tetraploidalnej *T. repens* z naturalnych stanowisk, jak i u eksperymentalnej formy oktoploidalnej występuje charakterystyczne ułożenie chromosomów w podziale mejotycznym wyłącznie w postaci biwalentów. Nie obserwowano u formy tetraploidalnej ani w diakinezie, ani w metafazie pierwszego podziału mejotycznego tetrawalentów, a u formy oktoploidalnej oktovalentów. Należy jednak zaznaczyć, że w stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego można było zaobserwować pewne różnice w wyglądzie biwalentów obu form. Stwierdzono (rys. 1, 2), że biwalenty formy oktoploidalnej posiadają wyższą liczbę chiazm i silniejszy stopień ich terminalizacji niż biwalenty formy tetraploidalnej *T. repens*.

Atwood i Hill (1940) stwierdzili u formy tetraploidalnej ($2n = 32$) ze stanowisk w USA i Nowej Zelandii wyjątkowo 15 biwalentów i 2 uniwalenty. Levan (1942), Atwood (1944), Brewbaker, Keim (1953) i Evans (1955) stwierdzili natomiast u formy auto-oktoploidalnej *T. repens* ($2n = 64$) zarówno obecność biwalentów, jak i uniwalentów i tetrawalentów. Podobnie i u innych gatunków poliploidalnych z rodzaju *Trifolium* obserwowano w podziale mejotycznym zarówno bi- jak i uni- i tetrawalenty (Levan 1940, Yates, Britton 1952, Kazubowska-Mackiewicz 1964).

Badania Müntzinga i Prakkena (1940) i Bijoka (1965a, 1965b), wykazują jednak, że u sztucznych autotetraploidów mogą w podziale mejotycznym występować chromosomy wyłącznie w postaci biwalentów.

Przebieg podziału mejotycznego w komórkach macierzystych pyłku u badanych form był normalny, co objawiało się brakiem zdegenerowanego pyłku. Występowanie zdegenerowanego pyłku obserwowali u *T. pratense* Bleier (1925), Kazubowska-Mackiewicz (1964) a u *T. ressupinatum* Ferreira de Almeida (1957). Powodem tego były przypuszczalnie zaburzenia w podziale mejotycznym komórek macierzystych pyłku, w postaci nie zsynchronizowanego rozchodzenia się chromosomów w stadium anafazy na bieguny, względnie jak u *T. pratense* (Bleier 1925) wykształcanie się jednobiegunowego wrzeciona kariokinetycznego.

Wielokomórkowy archespor obserwowali u *T. hybridum*, *T. pratense* i *T. repens* Martin (1914), Poliakowa i Sołomina (1952) i Kazubowska-Mackiewicz (1964).

Z przeprowadzonych badań u obu form *T. repens* wynika, że podziały mejotyczne zachodzą we wszystkich komórkach macierzystych makrospor. W ten sposób powstaje kilka tetrad makrospor, z których tylko jedna tetrada, najbliższa okienka, a właściwie makroskopra chalazalna, rozwija się w jeden ośmioletrowy woreczek zalążkowy typu monosporialnego. Martin (1914) u *T. hybridum* i *T. repens*, Poliakowa (1952, 1956), Povilajtis i Boyes (1960) oraz Kazubowska-Mackiewicz (1964) opisują występowanie u *T. pratense* tylko jednej komórki macierzystej woreczka zalążkowego, a w dalszym ciągu również tylko jednego ośmioletrowego woreczka zalążkowego typu monosporialnego.

Pozostałe komórki macierzyste woreczka zalążkowego z obumierającymi trzema makrosporami od strony okienka ulegają zepchnięciu na ścianę ośrodką, względnie w stronę chalazalną zalążka.

Woreczek zalążkowy u obu badanych form posiada typową budowę, zgodnie z badaniami innych cytowanych autorów nad gatunkami z rodzaju *Trifolium*.

Antypody u obu badanych form podobnie jak i u *T. pratense* i *T. hybridum* (Martin 1914, Kazubowska-Mackiewicz 1964) degenerują bardzo wcześnie. Należy sądzić na podstawie przeprowadzonych obserwacji, że antypody degenerują w czasie dojrzewania woreczka zalążkowego.

Zalążnia u obu form *T. repens* jest jednokomorowa i zawiera od czterech do siedmiu zalążków, w większości przypadków jednak sześć zalążków. Nie obserwowano różnic w rozmiarach zalążków znajdujących się w jednej zalążni.

Należy stwierdzić, że rozwój woreczka zalążkowego we wszystkich badanych zalążkach przebiegał normalnie. Nie obserwowano bowiem w żadnym przypadku zalążków o zdegenerowanym woreczku, względnie pozbawionych zupełnie woreczków zalążkowych, jak to wynika z badań Povilajtisa i Boylesa (1959), Damischa (1963) i Kazubowskiej-Mackiewicz (1964), prowadzonych u *T. pratense*.

W zakończeniu należy stwierdzić, że w trakcie omówionych wyżej badań nie znaleziono żadnych zasadniczych różnic w rozwoju embriologicznym pomiędzy oktoploidami *T. repens* i ich formami wyjściowymi, które mogłyby mieć decydujący wpływ na obniżoną płodność kolchiploidów. Przyczyny te tkwią przypuszczalnie w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodka. Zagadnienie to jest przedmiotem prowadzonych badań i będzie tematem dalszej rozprawy.

STRESZCZENIE

1. W toku niniejszej pracy potwierdzono liczby $n=16$, $2n=32$ u formy tetraploidnej (rys. 1) i $n=32$, $2n=64$ chromosomów u formy oktoploidnej (rys. 2) *Trifolium repens* (Bijok, Góral, Góral, 1968) na podstawie obserwacji nad mejozą w komórkach macierzystych pyłku i woreczka zalążkowego.

2. Zarówno u formy tetraploidnej ($2n=32$) *T. repens* z naturalnych stanowisk północnej Polski, jak i u eksperymentalnej formy oktoploidnej ($2n=64$) chromosomy w podziale mejotycznym występują wyłącznie w postaci biwalentów (rys. 1, 2). Należy jednak zaznaczyć, że w stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego biwalenty formy oktoploidnej posiadają wyższą liczbę chiazm i silniejszy stopień terminalizacji niż biwalenty formy tetraploidnej *T. repens* (rys. 1, 2).

3. Warstwa tapetum u obu badanych form różnicuje się w stadiach premejotycznych komórek macierzystych pyłku. Komórki tapetum są jednojądrowe o jądrach diploidalnych.

4. Przebieg podziału mejotycznego w komórkach macierzystych pyłku był w obu przypadkach normalny, dlatego nie obserwowano zdegenerowanego pyłku (rys. 3—16, 17—30).

5. U obu badanych form występuje archespor wielokomórkowy (rys. 31, 44). Komórki archesporu przechodzą w komórki macierzyste makrospor bez oddzielenia komórek przykrywkowych. Podziały mejotyczne zachodzą we wszystkich komórkach macierzystych makrospor (rys. 32, 33, 45—47). W ten sposób powstaje kilka tetrad makrospor (rys. 33, 48), z których tylko jedna tetrada, najbliższa okienka, a właściwie jej makrospora chalazalna (rys. 34, 35, 44) rozwija się w jeden ośmiojądrowy woreczek zalążkowy typu monosporialnego (rys. 40, 52). Woreczek zalążkowy u obu form *T. repens* posiada budowę typową (rys. 41—43, 53—55).

6. Zalążnia jest jednokomorowa i obejmuje od czterech do siedmiu zalążków, w większości przypadków jednak sześć zalążków. Nie obserwowano różnic w rozmiarach zalążków znajdujących się w jednej zalążni.

7. Rozwój woreczka zalążkowego następuje normalnie we wszystkich zalążkach badanych form. Nie obserwowano zalążków o zdegenerowanych, względnie pozbawionych woreczków zalążkowych.

8. W trakcie omawianych w niniejszej pracy badań nie znaleziono różnic w rozwoju embriologicznym pomiędzy oktoploidami *T. repens* i ich formami wyjściowymi, a które zdawało się mogłyby mieć decydujący wpływ na obniżoną płodność kolchiploidów. Przyczyny te tkwią prawdopodobnie w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodka.

Katedra Genetyki WSR
w Olsztynie

(Wpłynęło dn. 12.4.1969 r.)

SUMMARY

In the course of the present work the following chromosome numbers have been confirmed: $n=16$, $2n=32$ in the tetraploid form (Fig. 1) and $n=32$, $2n=64$ chromosomes in the octoploid form (Fig. 2) of *Trifolium repens* (Bijok, Góral, Góral, 1968) during observations of meiosis in mother pollen cells and embryo sac.

Only bivalent chromosomes (Fig. 1 and 2) occurred in the meiotic division both in the tetraploid form ($2n=32$) of *T. repens* of natural sites of northern Poland and in the experimental octoploid form. It should be stressed, however, that at the metaphase stage of the first meiotic division the bivalents of the octoploid form have a higher number of chiasmata and a more pronounced degree of terminalization than the bivalents of the tetraploid form of *T. repens* (Figs. 1 and 2).

The tapetal layer both of the tetra- and octoploid forms develops in the pre-meiotic stages of mother pollen cells. The tapetum cells are uninucleate; their nuclei are diploid.

The course of the meiotic division in the mother pollen cells of the studied forms was normal, so that no degenerate pollen could be seen (Figs. 3—16 and 17—30).

A multicellular archesporium (Figs. 31 and 44) occurs in the forms under study. Archesporium cells pass into macrospore mother cells without a separation of covering cells. Meiotic divisions take place in all macrospore mother cells (Figs. 32, 33 and 45—47). In this way there develop a few macrospore tetrads (Figs 33—48) of which only one, the nearest to the micropyle, or to be more exact its chalazal macrospore (Figs. 34, 35 and 49) develops into one octonucleate embryo sac of the monosporial type (Figs. 40 and 52).

The embryo sac of the two forms of *T. repens* shows a typical structure (Figs 41—43, and 53—55).

The ovary of the studied forms of *T. repens* is monocellular and it contains from four to seven embryos; in most cases there are six embryos. No differences have been observed in the size of the embryos found in one ovary.

The embryo sac of the two forms of *T. repens* shows a typical structure. No embryos have been found with degenerate embryo sacs or devoid of embryo sacs.

In the course of the present studies no differences have been found in the embryonal development between the octoploids of *T. repens* and their initial forms; the differences could have had a decisive effect upon the lower reproductive ability to reproduce among colchicoids. The reasons should be probably sought for in the process of fertilization and of embryo development. This problem is under study and will be presented in a future publication.

LITERATURA

- Atwood S. S., Hill H. D., 1940, The regularity of meiosis in microsporocytes of *Trifolium repens*, Am. Jour. Bot. 27: 730—735.
- Atwood S. S., 1944, Colchicine — induced polyploids in white clover, Journ. Am. Soc. Agron. 36: 173—173.
- Bijok K., 1965a, Studia kariologiczne i embriologiczne nad tetraploidem eksperymentalnym, uzyskanym przez podwojenie liczby chromosomów *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schür.) Beck., Zesz. Nauk. WSR Olsztyn 19: 213—235.

- Bijok K., 1965b, Badania cytogenetyczne nad gatunkami *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schür.) Beck. i *Chrysanthemum corymbosum* L. Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie 19: 297—345.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1968, Badania cytologiczne i osadzanie nasion u poliploidalnych form *Trifolium repens* L., Hodowla, Nasiennictwo i Aklimatyzacja 12: 423—435.
- Bleier H., 1925, Chromosomenzahlen und Kernvolumina in der Gattung *Trifolium*, Ber. Deutsch. Bot. Ges. 43: 236—238.
- Bleier H., 1925, Chromosomenstudien bei der Gattung *Trifolium*, Jahrb. wiss. Bot. 64: 604—636.
- Brewbaker J. L., Keim W. F., 1953, A fertile interspecific hybrid in *Trifolium* (4n *T. repens* L. $\times$ 4n *T. nigrescens* Viv.), Am. Nat. 87: 323—326.
- Damisch W., 1963, Über den Einfluss biologischer Faktoren auf den Samenanatz bei Rotklee, Biol. Zentralbl. 82.
- Desseraux L., 1951, Ovula formation as a factor influencing seed setting of Ladino white clover, Sci. agr. 31: 373—382.
- Evans A. M., 1955, The production and identification of poliploids in red clover, white clover and lucerne, New Phytol., 54: 149—162.
- Ferreira de Almeida J. K., 1957, Trevos autotetraploides, I. O caso de *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveoleus* (Willd.) Dinsm., Agronomia Lusitana 19: 127—144.
- Hertzs W., 1954, Beobachtungen an kunstlich hergestellten poliploiden Futterpflanzen, Z. Pflanzenzüchtung 34: 59—70.
- Johansen D. A., 1950, Plant Embryology. Embryogeny of the *Spermatophyta*, Waltham, Mass USA Chr. Bot. Comp.
- Kazubowska-Mackiewicz T., 1964, Badania cytologiczno-embriologiczne przyczyn słabszego wiązania nasion u koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) w porównaniu z formą diploidalną. Manuskrypt.
- Levan A., 1940, Framställning ar tetraploid rödklöver, Sver. Ustäd. Tidskr. 50: 115—124.
- Levan A., 1942, Plant breeding by induction of polyploidy and some results in clover, Hereditas 28, 245.
- Löve A., Löve D., 1961, Chromosome numbers of central and northwest european plant species, Opera Bot. a Soc. Bot. Lundensi, Vol. 5.
- Mackiewicz H. O., 1958, Badania nad di- i tetraploidalną koniczyną szwedzka (*Trifolium hybridum*), Roczn. Nauk. Roln. 79-A-2, 677—688.
- Mackiewicz H. O., 1963, Studies on di- and tetraploid alsike clover (*Trifolium hybridum* L.) Part. I. Morphology and anatomy of vegetative organs, Gen. Pol. 4: 121—138.
- Müntzing A., Prakken R., 1940, The mode of chromosome pairing in Phleum twins 63 chromosomes and its cytogenetic consequences, Hereditas 26: 463—501.
- Maheshwari P., 1950, Embriology of Angiosperms, Mo. Grek-Holl Book Company Inc. York—Toronto—London.
- Martin J. N., 1914, Comparative morphology of some *Leguminosae*. The Bot. Gaz. 58: 154—167.
- Poljakowa G. F., 1956, O morfologicznych i funkcjonalnych izmienienjach elementow zarodyszego mieszkza, Wiestnik Leningradskiego Univ. Nr. 2.
- Poljakowa G. F., Solomina N., 1952, Citoembriologiczeskoje isledowanije krasnego klewiera — *Trifolium pratense* L. w swiazi z zadacziej powyszienija jego produktiwnoste w leningradskoj oblasti, Wiestnik Leningradskiego Univ. Nr 4.

- Povilaitis B., Boyes J. W., 1956, A cytological study of autotetraploid red clover, Am. Journ. Bot. 43: 169—174.
- Povilaitis B., and Boyes J. W., 1959, Embryosac production in relation to seed yields of diploid Dollard red clover, Can. Journ. of Plant Science 39: 364—374.
- Schnarf K., 1929, Embryologie der Angiospermen, Berlin.
- Schnarf K., 1931, Vergleichende Embryologie der Angiospermen, Berlin.
- Schönhoff P. N., 1926, Die Zytologie der Blütenpflanzen, Stuttgart Verl. von Ferdinand Eecke.
- Stebbins G. Z., 1958, Zmienność i ewolucja roślin, PWN, Warszawa.
- Tischler G., 1950, Die Chromosomenzahlen der Gefäßpflanzen Mitteleuropas, Uitgeverij Dr W. Junk's-Gravenhage.
- Yates J. J., Britton N. H., 1952, Cytological studies of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.), Austr. Journ. of Agric. Res. 3: 300—304.