Badania embriologiczne di- i tetraploidalnych form *Trifolium hybridum* L.

Embriological studies on di- and tetraploid forms of *Trifolium hybridum* L.

K. BIJOK, M. GÓRAL, St. GÓRAL

WSTĘP

Prace nad poliploidyzacją *Trifolium hybridum* L. zapoczątkowała w Polsce Łączyńska-Hulewicz (1957), poddając działaniu kolchicyny populacje uprawne tego gatunku w woj. poznańskim. Wyhodowana tą drogą tetraploidalna koniczyna *T. hybridum* wykazywała się licznymi cennymi właściwościami. Główną jej zaletą była stwierdzona przez Mackiewicza (1958, 1963, 1965) większa bujność roślin i związane z tym wyższe plony zielonej i suchej masy w stosunku do diploidalnych form wyjściowych. Podobnie jak u większości sztucznych poliploidów, zdwojenie liczby chromosomów u *T. hybridum* spowodowało obniżenie współczynnika rozmnażania. Według badań Mackiewicza (1958, 1963, 1965) oraz Bijoka, Góralowej, Górala (1969) tetraploidalne rośliny tego gatunku posiadają mniejszą liczbę kwiatostanów i kwiatów w główce, a strąki zawierają mniej nasion niż rośliny wyjściowe — diploidalne.

Stwierdzono ponadto, że tetraploidy mają większy procent nasion niedorozwiniętych oraz wyższy ciężar 1000 nasion. Wszystko to składa się w sumie na niski współczynnik rozmnażania u poliploidów *T. hybridum*.

Julén (cyt. Hulewiczowa 1957) i Hulewiczowa (1957) stwierdzili na podstawie długoletnich badań poliploidów *T. pratense*, że w hodowli koniczyn o zdwojonej liczbie chromosomów, podstawowym warunkiem powodzenia jest możliwie szeroka baza genetyczna materiału wyjściowego. W dalszej hodowli poliploidalnych odmian bardzo dobre efekty daje masowe krzyżowanie rodów i odmian różnego pochodzenia. Cytowani autorzy wykazali istnienie prostej współzależności pomiędzy różnorodnością materiału użytego do krzyżowania, a wysokością plonów uzyskanych z potomstwa i wyprowadzonych z niego odmian. Dodać przy

tym należy, że poprawa plonów odnosi się zarówno do zielonej masy, jak i do nasion.

Podobne spostrzeżenia poczynił Mackiewicz (1958, 1963, 1965), który stwierdził, że wśród badanych przezeń tetraploidów istniało wysokie zróżnicowanie pod względem poszczególnych cech. Zdaniem autora, nawet wśród niewielkiego materiału hodowlanego można było poprawić plony nasion drogą selekcji.

Znaczną różnorodność cech u poliploidów *T. hybridum* wyhodowanych z ekotypów pochodzących z woj. olsztyńskiego wykazali również Bijok, Góralowa, Góral (1969). Materiały te, w porównaniu z tetraploidami wyhodowanymi przez Łączyńską-Hulewicz, miały wprawdzie niższe plony zielonej masy, ale przewyższały je płodnością nasion. Z tych względów mogą one stanowić cenny materiał w krzyżówkowej hodowli poliploidalnych odmian *T. hybridum*.

Praca niniejsza jest częścią badań nad tymi materiałami roślinnymi mającą na celu znalezienie przyczyn zmniejszonej płodności u poliploidów *T. hybridum* w odniesieniu do materiału wyjściowego *T. hybridum* ze stanowisk naturalnych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem do badań embriologicznych były ekotypy *T. hybridum* ze stanowisk naturalnych okolic Olsztyna (Bartąg, Barczewko, Wadąg) oraz ich eksperymentalne poliploidy uzyskane na drodze działania roztworem kolchicyny.

Pączki kwiatowe i kwiaty zostały zebrane w 1967 r. z poletek doświadczalnych Katedry Genetyki WSR w Olsztynie.

Materiał utrwalono według Nawaszyna, zatopiono w parafinie przy 52°C i pokrojono na mikrotomie na skrawki o grubości 15 mikronów. Preparaty barwiono fioletem gencjanowym i różnicowano je roztworem fenolu w ksylenie (1 : 3).

Rysunki zostały wykonane aparatem Zeissa spod mikroskopu NfpK przy użyciu obiektywów 90× i 40× w połączeniu z okularzem K 20× i 12× Zeisa. Powiększenia rysunków podano przy odnośnych figurach.

WYNIKI

Liczby chromosomów

Liczby chromosomów u obu form badano w diakinezie, metafazie pierwszego podziału mejotycznego i w metafazie drugiego podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku, oraz w diakinezie i metafazie pierwszego podziału mejotycznego komórek macierzystych makrospor.

W badaniach tych ustalono dla formy diploidalnej $n=8$ (rys. 1), a dla formy tetraploidalnej $n=16$ (rys. 2) chromosomów. Obserwacje te potwierdziły ustalone poprzednio dla tych form liczby $2n=16$ i $2n=32$ chromosomów (Bijok, Góralowa, Góral 1969).

Zarówno u formy di-, jak i tetraploidalnej, chromosomy w mejozie występowały zawsze w postaci biwalentów. W żadnym przypadku nie obserwowano u formy tetraploidalnej tetrawalentów. Stwierdzono, że

1

2

Rys. 1. Biwalenty z metafazy pierwszego podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku formy diploidalnej *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$) ($\times 2400$)

Fig. 1. Bivalents from first metaphase in P.M.C's. diploid form *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$) ($\times 2400$)

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

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

biwalenty obu form różniły się w budowie morfologicznej; biwalenty formy tetraploidalnej posiadały większą liczbę chiazmy i silniejszy stopień terminalizacji niż biwalenty formy wyjściowej — diploidalnej.

Obserwacje nad rozwojem pyłku

A. Topografia pylnika

W młodym stadium rozwoju pylniki u obu badanych form posiadały cztery komory pylnikowe, w których występowały ściśle do siebie przylegające komórki macierzyste pyłku. Ich liczba na przekroju poprzecznym wynosiła od trzech do czterech komórek. W tym stadium rozwoju, podobnie jak u wielu innych roślin, w ścianie pylnika można było wyróżnić: skórkę, warstwę włóknistą, warstwę zanikającą i warstwę tapetum.

B. Tapetum

Warstwa tapetum obu form *T. hybridum* różnicowała się w stadiach premejotycznych komórek macierzystych pyłku. Komórki tapetum w tym stadium, na przekroju podłużnym pylnika były kształtu prawie kwadratowego, wypełnione cytoplazmą, w której wyraźnie widoczne były jądra komórkowe. Nie obserwowano w żadnym przypadku podziałów jąder w komórkach tapetum, jak również ich zlewania się, czy zwiększania liczby chromosomów na drodze endomitozy. Można z tego wnioskować, że jądra komórek tapetum u formy diploidalnej posiadają $2n=16$, a u formy tetraploidalnej $2n=32$ chromosomów.

W okresie dojrzewania ziarn pyłku, obserwowano proces degeneracji komórek tapetum. Objawiało się to zanikiem jądra, błon komórkowych i pojawieniem się wodniczek w cytoplazmie.

C. Podział mejotyczny komórek macierzystych pyłku

W komorach pylnikowych, tak u formy di-, jak i tetraploidalnej *T. hybridum*, komórki macierzyste pyłku występowały zawsze w tym samym stadium podziałowym. Początkowo przylegały one ściśle do siebie, jednak w miarę wzrostu pylnika na długość, zaokrąślały się, co powodowało powstawanie między nimi przestworów międzykomórkowych. W stadium diakinezy były widoczne jako pojedyncze komórki, luźno leżące w komorach pylnikowych.

Badania podziałów mejotycznych przeprowadzono od diakinezy w komórkach macierzystych pyłku. W stadium diakinezy u diploidalnej formy *T. hybridum* z stanowisk naturalnych, obserwowano wykształcanie się zawsze ośmiu biwalentów (rys. 3). U sztucznych tetraploidów *T. hybridum* występowały również, podobnie, jak u formy diploidalnej biwalenty, jednak w liczbie podwojonej, czyli w ilości szesnastu par (rys. 16). Zarówno u formy diploidalnej, jak i tetraploidalnej, koniugujące chromosomy w tym stadium przyjmowały pewne stałe konfiguracje.

W metafazie pierwszego podziału mejotycznego, tak jak i w diakinezie, u obu form występowały te same liczby biwalentów $n=8$ i $n=16$ (rys. 1, 2, 4, 5, 17, 18). Płytki chromosowe w tym stadium leżały w środku komórki macierzystej pyłku, bądź w rzadkich przypadkach były zepchnięte w stronę ich obwodu (rys. 4, 5, 17, 18). Po normalnej kongresji chromosomów, po obu stronach płytki chromosowej obserwowano wyraźnie wykształcone wrzeciona kariokinetyczne (rys. 4, 17).

W stadium anafazy pierwszego podziału mejotycznego rozchodzenie się chromosomów na bieguny było zsynchronizowane i przebiegało bez jakichkolwiek zaburzeń (rys. 6, 19). Pomiedzy rozchodzącymi się na bieguny chromosomami występował normalnie wykształcony fragmo-

Rys. 3—15. Rozwój pyłku u diploidalnej formy *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$); 3 — diakineza, 4 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 5 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 6, 7 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 8 — metafaza drugiego podziału meiotycznego, 9, 10 — anafaza i telofaza drugiego podziału meiotycznego, 11 — tetrada mikrospor, 12, 13 — pierwotne ziarno pyłku, 14 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym, 15 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1200$)

Fig. 3—15. Development of pollen in diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$); 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 — pollen grain with vegetative and generative nucleus, 15 — pollen grain with vegetative and two sperm nuclei ($\times 1200$)

plast (rys. 6, 19), który zanikał po powstaniu dwóch jąder potomnych (rys. 7, 20).

W stadium metafazy drugiego podziału meiotycznego, oba wrzecionna kariokinetyczne i obie płytki metafazowe układały się prostopadle, względnie równolegle do siebie (rys. 8, 21).

W stadium anafazy drugiego podziału meiotycznego, podobnie jak w stadium anafazy pierwszego podziału meiotycznego, chromosomy rozdziły się również zsynchronizowane na bieguny (rys. 9, 22). Podob-

Rys. 16—28. Rozwój pyłku u tetraploidalnej formy *Trifolium hybridum* ($n=16$, $2n=32$); 16 — diakineza, 17 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 18 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 19, 20 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 21 — metafaza drugiego podziału meiotycznego, 22, 23 — anafaza i telofaza drugiego podziału meiotycznego, 24 — tetrada mikrospor, 25, 26 — pierwotne ziarno pyłku, 27 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym, 28 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1200$)

Fig. 16—28. Development of pollen in tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($n=16$, $2n=32$); 16 — diakinesis, 17 — first metaphase in P.M.C's., 18 — first metaphase in P.M.C's. — polar view, 19, 20 — first anaphase and telophase in P.M.C's., 21 — second metaphase in P.M.C's., 22, 23 — second anaphase and telophase in P.M.C's., 24 — formation of microspore tetrads, 25, 26 — original pollen grain, 27 — pollen grain with vegetative and generative nucleus, 28 — pollen grain with vegetative and two sperm nuclei ($\times 1200$)

nie i w tym stadium wykształcały się wyraźne fragmoplasty (rys. 9, 22) pomiędzy rozchodzącymi się na bieguny chromosomami.

W stadium telofazy drugiego podziału meiotycznego, występowały u obu form, w każdej komórce macierzystej pyłku cztery jądra, a pomiędzy nimi sześć fragmoplastów (rys. 10, 23).

Wykształcanie się tetrady mikrospor zachodziło u obu form według podziału równoczesnego (rys. 10, 11, 23, 24), który to podział uważany jest za charakterystyczny dla *Dicotyledones* (Tahara 1915, 1921; Faar 1918; Schurhoff 1923; Castetter 1925; Bijok 1965; Adamkiewicz* 1966; Mijok, Góral, Góral 1970).

D. Rozwój ziarn pyłku

Pierwotne ziarna pyłku bezpośrednio po podziale komórki macierzystej pyłku otoczone były pojedynczą błoną — intyną (rys. 12, 25). Egzyna wykształcała się w dalszych stadiach ich rozwoju, w której widoczne były sięgające do intyny trzy zagłębienia — pory (rys. 13—15, 26—28).

W młodych ziarnach pyłku obserwowano duże, o luźnej strukturze jądro komórkowe, zepchnięte w kierunku błony komórkowej przez centralnie umieszczoną wodniczkę (rys. 13, 26). W starszym stadium rozwoju, w ziarnach pyłku występowały dwa jądra: większe, o luźnej strukturze — wegetatywne, i mniejsze, o strukturze silnie zwartej — generatywne (rys. 14, 27). To ostatnie było otoczone cienką warstwą ziarnistej cytoplazmy (rys. 14, 27).

Dojrzałe ziarna pyłku posiadały trzy jądra, a mianowicie: wegetatywne i dwa plemnikowe (rys. 15, 28). Jądra plemnikowe, podobnie jak jądro generatywne, otoczone były cienką warstwą własnej cytoplazmy (rys. 15, 28).

W tym czasie następowało pękanie pylników i wysypywanie się pyłku.

Wielkość ziarn pyłku u obu form *T. hybridum* była różna, a mianowicie: średnia wielkość 100 badanych ziarn pyłku u diploidalnej formy wynosiło 13,67 mikronów, zaś u formy tetraploidalnej 17,80 mikronów.

Obserwacje nad rozwojem zalążka

A. Topografia zalążka

Zalążek u badanych form *T. hybridum*, podobnie jak u innych gatunków tego rodzaju, był amfitropowy, cienkoośrodkowy o podwójnym integumencie. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że integument wewnętrzny posiadał tylko dwie warstwy komórek.

W jednokomorowej zalążni obserwowano występowanie dwóch wyjątkowo trzech zalążków, przy czym nie stwierdzono różnicy w wielkości pomiędzy zalążkami jednej zalążni.

Rys. 29—38. Rozwój woreczka zalążkowego u formy diploidalnej *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$); 29 — archespor dwukomórkowy, 30 — podziały meiotyczne w komórkach archesporialnych, 31 — tetrazy makrospor, 32 — komórki macierzyste woreczka zalążkowego z zanikającymi makrosporami od strony okienka, 33 — dwujądrowy woreczek zalążkowy, 34 — czterojądrowy woreczek zalążkowy, 35 — ośmiojądrowy woreczek zalążkowy, 36 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowymi i jądrami biegunowymi, 37 — chalazalna część woreczka zalążkowego z trzema antypodami, 38 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego ($\times 560$)

Figs. 29—38. Development of embryo sac in diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($n=8$, $2n=16$); 29 — bicellular archespor, 30 — meiotic division in archespor cells, 31 — tetrads of megaspores, 32 — mononucleate embryo sacs, 33 — binucleate embryo sac, 34 — four-nucleate embryo sac, 35 — eight-nucleate embryo sac, 36 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and polar nuclei, 37 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells, 38 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary embryo sac nucleus ($\times 560$)

U badanych form, ośrodek występował w postaci jednej warstwy komórek, które ulegały degeneracji od stadium ośmiojądrowego woreczka zalążkowego.

B. Archespor

Archespor u obu form *T. hybridum* był dwukomórkowy (rys. 29, 39). Komórki archesporu, w miarę jak zachodziły w nich podziały meiotyczne, rozrastały się w kierunku podłużnej osi zalążka, i wciskały się stopniowo między komórki chalazy (rys. 29—32, 39—42).

C. Rozwój woreczka zalążkowego

Komórki archesporu obu cytotypów *T. hybridum* przekształcały się wprost w komórki macierzyste makrospor. Nie obserwowano oddzielania się komórek przykrywkowych.

Komórki macierzyste makrospor w jednym zalążku, występowały w

Rys. 39—48. Rozwój woreczka zalążkowego u formy tetraploidalnej *Trifolium hybridum* ($n=16$, $2n=32$); 39 — archespor dwukomórkowy, 40 — podziały mejotyczne w komórkach archesporialnych, 41 — tetrady makrospor, 42 — komórki macierzyste woreczka zalążkowego z zanikającymi makrosporami od strony okienka, 43 — dwujądrowy woreczek zalążkowy, 44 — czterojądrowy woreczek zalążkowy, 45 — ośmiejądrowy woreczek zalążkowy, 46 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i jądrami biegunowymi, 47 — chalazalna część woreczka zalążkowego z trzema antypodami, 48 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego ($\times 525$)

Figs. 39—48. Development of embryo sac in tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($n=16$, $2n=32$); 39 — bicellular archespor, 40 — meiotic divisions in archespor, 41 — tetrads of megaspores, 42 — mononucleate embryo sacs, 43 — binucleate embryo sac, 44 — four-nucleate embryo sac, 45 — eight-nucleate embryo sac, 46 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and polar nuclei, 47 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells, 48 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary nucleus ($\times 525$)

różnych, względnie w tych samych stadiach podziałowych (rys. 30, 40). Podziały mejotyczne zachodziły w obydwu komórkach macierzystych makrospor (rys. 30, 40). W starszych stadiach rozwojowych zalążka, obserwowano w zalążkach tetrady makrospor (31, 40), względnie dwie komórki macierzyste woreczka zalążkowego z zanikającymi trzema makrosporami od strony okienka (rys. 32, 42). W rozwoju woreczka zalążkowego brała udział chalazalna makrospora, najbliższa okienka (rys. 32, 33, 42, 43), druga natomiast ulegała zepchnięciu w kierunku chalazalnym zalążka, gdzie degenerowała (rys. 43).

W dalszym rozwoju woreczka zalążkowego, obserwowano woreczki zalążkowe dwu-, cztero-, i ośmiejądrowe (rys. 33—35, 43—45). W wo-

reczku dwu- i czterojądrowym, pomiędzy jądrami od strony okienka i jądrami od strony chalazy występowała dość silnie wykształcona wodniczka (rys. 33, 34, 43, 44).

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że woreczek zalążkowy u obu badanych form *T. hybridum* był ośmiojądrowy typu monosporialnego (rys. 35, 45).

Wykształcony i dojrzały woreczek zalążkowy zarówno u formy diploidalnej, jak i formy tetraploidalnej *T. hybridum* posiadał typową budowę (rys. 36—38, 46—48). Występował w nim aparat jajowy składający się z komórki jajowej i dwóch synergid, duże, o luźnej strukturze wtórne jądro woreczka zalążkowego, powstałe z dwóch jąder bieguncowych i antypody w liczbie trzech komórek (rys. 36—38, 46—48).

U obu badanych form *T. hybridum*, co należy wyraźnie podkreślić, woreczki zalążkowe wykształcały się we wszystkich zalążkach. Nie obserwowano zalążków ze zdegenerowanymi, względnie z niecałkowicie rozwiniętymi woreczkami zalążkowymi.

Rys. 49. Wykresy średnic jąder komórkowych dermatogenu w mikronach
1 — forma diploidalna *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — forma tetraploidalna *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Fig. 49. Graphs of cells nuclei dermatogen in microns
1 — diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Rys. 50. Wykresy średnicy jąder komórkowych periblemu w mikronach
1 — forma diploidalna *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — forma tetraploidalna *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Fig. 50. Graphs of cell nuclei periblem in microns
1 — diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Rys. 51. Wykresy długości aparatów szparkowych w mikronach
1 — forma diploidalna *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — forma tetraploidalna *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Fig. 51. Graphs of the stomata length in microns

1 — diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Rys. 52. Wykresy średnic ziarn pyłku w mikronach

1 — forma diploidalna *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — forma tetraploidalna *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Fig. 52. Graphs of pollen grain diameter in microns

1 — diploid form of *Trifolium hybridum* L. ($2n=16$); 2 — tetraploid form of *Trifolium hybridum* ($2n=32$)

Analiza pewnych cech anatomicznych formy di- i tetraploidalnej *T. hybridum*

Wykresy 49—52 przedstawiają pomiary średnic jąder komórkowych dermatogenu i peryblemu, długość komórek aparatów szparkowych w liściach oraz pomiary średnic ziarn pyłku tak u formy diploidalnej z stanowisk naturalnych, jak i sztucznych tetraploidów *T. hybridum*. Analiza wymienionych cech anatomicznych, w porównaniu z badaniami morfologicznymi obu form (Bijok, Góral, Góral 1969) wykazała, że są one całkowicie zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami odnośnie różnic w cechach anatomiczno-morfologicznych u form poliploidalnych w odniesieniu do ich form wyjściowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Celem niniejszej pracy było bliższe poznanie stosunków cytologiczno-embriologicznych u form di- i tetraploidalnych *T. hybridum* oraz ewentualne znalezienie przyczyn obniżonej płodności u poliploidów.

Przeprowadzone obserwacje wykazały, że ustalone liczby chromosomów dla formy diploidalnej $2n=16$ i tetraploidu eksperymentalnego $2n=32$ (Bijok, Góral, Góral 1969) są zgodne z liczbami $n=3$ i $n=16$, obserwowanymi w podziale mejotycznym komórek macierzystych pyłku i makrospora (rys. 1, 2).

W toku badań, stwierdzono, że chromosomy obu badanych form, zarówno w diakinezie, jak i w metafazie pierwszego podziału mejotycznego koniugowały z sobą wyłącznie w postaci biwalentów (rys. 1, 2, 3—5, 16—18). Nie stwierdzono w żadnym przypadku występowania uniwalentów, czy też tetrawalentów. Szczegółowe badania biwalentów wykazały, że u tetraploida eksperymentalnego ($2n=32$) biwalenty posiadały większą liczbę chiazmy i silniejszy stopień terminalizacji niż biwalenty formy wyjściowej ($2n=16$).

Atwood, Hill (1940) u tetraploidów *T. repens* ze stanowisk naturalnych w USA i Nowej Zelandii obserwowali w podziale mejotycznym piętnaście biwalentów i wyjątkowo dwa uniwalenty. Levan (1942), Atwood (1944), Brewbaker, Keim (1953) i Evans (1955) u eksperymentalnej autotetraploidalnej formy *T. repens*, w stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego, stwierdzili występowanie poza biwalentami, również uniwalentów i tetrawalentów. Do podobnych wyników doszli u innych eksperymentalnych form z rodzaju *Trifolium* (Levan 1940), Yates, Britton (1952) i Kazubowska-Mackiewicz (1964).

Prace Müntzinga i Prakkena (1940) nad gatunkami z rodzaju *Phleum*, Bijoka (1965, 1965) nad diploidalnym *Chrysanthemum subcorymbosum* i tetraploidalnym *Ch. corymbosum* ze stanowisk naturalnych w Polsce oraz eksperymentalnym autotetraploidalnym *Ch. subcorymbosum* wykazały, że w podziale mejotycznym u tych gatunków występują jedynie biwalenty, podobnie jak to stwierdzono u eksperymentalnych autotetraploidalnych form *T. hybridum*.

Badania Bijoka, Góralowej i Górala (1970) nad mejozą u roślin poliploidalnych z naturalnych stanowisk północnej Polski i u eksperymentalnych oktoploidów *T. repens*, wykazały również koniugację chromosomów w postaci biwalentów.

Podziały mejotyczne u obu form (rys. 3—15, 16—28) miały przebieg normalny i dlatego nie obserwowano u nich zdegenerowanego pyłku. Stwierdzono to również u tetraploidów i oktoploidów *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970). Występowanie zdegenerowanego pyłku spowodowane jest najczęściej zaburzeniami w czasie podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku. Objawia się to w niesynchronizowanym rozchodzeniu się chromosomów na bieguny (Kazubowska-Mackiewicz 1964), lub jak to obserwował Bleier (1925) u *T. pra-*

tense, przez tworzenie się nienormalnego, jednobiegunowego wrzeciona kariokinetycznego. Zdegenerowany pyłek w komorach pylnikowych zaobserwowali Bleier (1925), Kazubowska-Mackiewicz (1964) u *T. pratense*, a Ferreira de Almeida (1957) u *T. resupinatum*.

U *T. hybridum* z terenów północnej Polski i jej formy autotetraploidalnej stwierdzono archespor dwukomórkowy (rys. 29, 30, 39, 40). Natomiast u *T. hybridum*, *T. pratense* i *T. repens* szereg autorów (Martin 1914; Poliakowa i Sołomina 1952; Kazubowska-Mackiewicz 1964; Bijok, Góral, Góral 1970) obserwowało występowanie archesporu wielokomórkowego.

Z przeprowadzonych badań u poliploidalnych form *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970) wynika, że podziały mejotyczne przebiegały normalnie we wszystkich komórkach macierzystych makrospor. Z powstałych tą drogą dwóch tetrad makrospor, z najbliższej tetrady okienka, makrospora chalazalna dawała początek jednemu, ośmioletowemu woreczkowi zalążkowemu typu monosporialnego. Pozostałe natomiast obumierały. Stwierdzono to również u badanych form *T. hybridum* (rys. 29—48).

U *T. hybridum*, *T. repens* i *T. pratense* Martin (1914), Poliakowa (1952, 1956), Povilajtis i Boyes (1960) oraz Kazubowska-Mackiewicz (1964) stwierdzili wykształcanie się tylko jednej komórki macierzystej woreczka zalążkowego i z dalszego jej rozwoju, jednego ośmioletowego woreczka zalążkowego, typu monosporialnego.

Woreczek zalążkowy, u badanych form posiadał typową budowę (rys. 35—38, 45—48).

Antypody u *T. pratense* i *T. hybridum* (Martin 1914; Kazubowska-Mackiewicz 1964) obumierają wcześniej. Z przeprowadzonych obserwacji u obu form *T. hybridum* wynikało, że antypody degenerują w okresie dojrzewania woreczka zalążkowego. W okresie, kiedy obserwowano w woreczku zalążkowym typowy aparat jajowy i wtórne jądro woreczka zalążkowego, antypody były trudne do zaobserwowania. Potwierdziły to również obserwacje przeprowadzone u form poliploidalnych *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970).

Zalążnia u badanych form *T. hybridum* była jednokomorowa, wielozalążkowa, co potwierdzają również prace Kazubowskiej-Mackiewicz (1964), u *T. pratense* i Bijoka, Góralowej i Górala (1970) u *T. repens*. Zalążki w zalążni były wszystkie jednakowych rozmiarów, podobnie, jak to stwierdzono u *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970). Kazubowska-Mackiewicz (1964) stwierdziła jednak u *T. pratense* pewne zróżnicowanie w rozmiarach pomiędzy zalążkami zajmującymi miejsce środkowe i końcowe w komorze zalążni,

co jest powodem powstawania u koniczyny czerwonej jednonasiennych strąków.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że rozwój woreczka zalążkowego miał u obu badanych form przebieg normalny we wszystkich zalążkach. To samo stwierdzono u *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970). Povilajtis i Boyles (1959), Damisch (1963) i Kazubowska-Mackiewicz (1964) wykazali natomiast, że u *T. pratense* występowały zalążki ze zdegenerowanymi woreczkami zalążkowymi lub nawet ich pozbawione.

Na zakończenie omawiania wyników niniejszej pracy należy podkreślić, że z przeprowadzonych obserwacji u *T. hybridum*, podobnie jak to również stwierdzono u poliploidalnych form *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970), nie wynika, aby w rozwoju embriologicznym zaistniały przyczyny, które mogłyby wpłynąć na obniżoną płodność kolchiploidów. Przyczyny tego zjawiska prawdopodobnie mogą tkwić (Bijok, Góral, Góral 1970) w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodka. Zagadnienie to jest przedmiotem dalszych badań.

STRESZCZENIE

W toku przeprowadzonych badań, potwierdzono liczby chromosomów $n=8$ (rys. 1) u roślin diploidalnych *T. hybridum* ze stanowisk naturalnych północnej Polski i $n=16$ (rys. 2) u eksperymentalnego tetraploida *T. hybridum* w mejozie macierzystych komórek pyłku i makrospor.

Zarówno u formy diploidalnej *T. hybridum* ($2n=16$), jak i u eksperymentalnego tetraploida *T. hybridum*, w diakinezie i metafazie pierwszego podziału mejozytycznego występowały biwalenty (rys. 1, 2, 3—5, 16—18). Biwalenty formy tetraploidalnej posiadały większą liczbę chiazmy i silniejszy stopień terminalizacji od biwalentów formy wyjściowej *T. hybridum* (rys. 1, 2).

Komórki tapetum wykształcały się w stadiach premejozytycznych komórek macierzystych pyłku. Komórki tej warstwy były jednojądrowe o jądrach diploidalnych.

Podziały mejozytyczne w komórkach macierzystych pyłku odbywały się normalnie i dlatego nie obserwowano zdegenerowanego pyłku (rys. 3—28). Dojrzałe ziarna pyłku były trójjądrowe i zawierały: jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe (rys. 15, 28).

Archespor u badanych form był dwukomórkowy (rys. 29, 39). Komórki arche-sporu przechodziły, bezpośrednio w komórki macierzyste makrospor, bez oddzielania komórek przykrywkowych. Podziały mejozytyczne przebiegały w obu komórkach macierzystych makrospor (rys. 30, 40). Powstawały stąd dwie tetrady makrospor. Makrospora chalazalna tetrady najbliższej okienka, dawała początek ośmiojądrowemu woreczkowi zalążkowemu typu monosporialnego (rys. 31—35, 41—45). Woreczek zalążkowy posiadał normalną budowę (rys. 36—38, 46—48).

Zalążania u obu form była jednokomorowa i zawierała 2, wyjątkowo 3 zalążki. Pomiędzy zalążkami w jednej zalążni brak było zróżnicowania w rozmiarach. Nie obserwowano zalążków pozbawionych, względnie o zdegenerowanych woreczkach zalążkowych.

W badaniach embriologicznych obu form *T. hybridum* nie znaleziono przyczyn, które byłyby powodem obniżonej płodności u eksperymentalnych tetraploidów *T. hybridum*. Przyczyny tego zjawiska prawdopodobnie mogą tkwić w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodka. Zagadnienie to jest przedmiotem dalszych badań.

Katedra Genetyki WSR
w Olsztynie

(Wpłynęło dn. 16.5.1969 r.)

SUMMARY

In the course of the carried out studies there have been confirmed the chromosome numbers $n=8$ (Fig. 1) in diploid plants of *T. hybridum* of the natural stands of northern Poland and $n=16$ (Fig. 2) in the experimental tetraploid of *T. hybridum* in meiosis of mother pollen cells and macrospores.

Bivalents (Figs. 1, 2, 3—5, 16—18) have been found in diakinesis and the metaphase of the first meiotic division both in the diploid ($2n=16$) and experimental tetraploid forms of *T. hybridum*. The bivalents of the tetraploid form showed a higher number of chiasmata and a more pronounced degree of terminalization than the bivalents of the initial form of *T. hybridum* (Figs. 1, 2).

Tapetum cells developed at the premeiotic stages of mother pollen cells. The cells of that layer were uninucleate and contained somatic numbers of chromosomes.

The meiotic divisions in the mother pollen cells were normal and therefore no degenerate pollen could be seen (Figs. 3—28). The mature pollen grains were trinucleate and contained: a vegetative nucleus and two sperm nuclei (Figs. 15, 28).

The archesporial cells of the studied forms were bicellular (Figs. 29, 39); the archesporial cells passed directly into mother macrosporal cells without a separation of covering cells. Meiotic divisions took place in the two mother cells of the macrospore (Figs. 30, 40), giving thus rise to two macrosporal tetrads.

Tetrad chalazal macrospore nearest to the micropyle gave rise to an octonucleate embryo sac of the monosporial type (Figs. 31—35, 41—45). The structure of the embryo sac was normal (Figs. 36—38, 46—48).

The ovary of the two forms was monocelled and contained 2 or rarely 3 embryos. The embryos found in one ovary revealed no differences in size. There have not been found any embryos with degenerate embryo sacs or devoid of them.

The embryological studies on the two forms of *T. hybridum* have not revealed any causes which could be responsible for a lower ability of experimental tetraploids of *T. hybridum* to reproduce. The reasons should be probably looked for in the process of fertilization and the development of the embryo. This problem is being studied.

LITERATURA

- Adamkiewicz E., 1966, Studia nad kariologicznym zróżnicowaniem tapetum u *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh., Zesz. Nauk. WSR. Olsztyn, 22: 301—311.
- Atwood S. S., 1944, Colchicine-induced polyploids in white clover, Journ. Am. Sc. Agron. 36: 173—174.
- Atwood S. S., Hill H. D., 1940, The regularity of meiosis in microsporocytes of *Trifolium repens*, Am. Jour. Bot. 27: 730—735.

- Bijok K., 1965, Studia kariologiczne i embriologiczne nad tetraploidem eksperymentalnym, uzyskanym przez podwojenie liczby chromosomów *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schur.) Beck., Zesz. Nauk. WSR, Olsztyn, 19: 213—235.
- Bijok K., 1965, Badania cytogenetyczne nad gatunkami *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schur.) Beck., *Chrysanthemum corymbosum* L., Zesz. Nauk. WSR, Olsztyn, 19: 297—345.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1969, Badania cytologiczne oraz biologii kwitnienia i osadzanie nasion u kolchipsoidów *Trifolium hybridum* L., Hod. Rośl. Aklim. i Nasienn. 13: 89—103.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1968, Badania cytologiczne i osadzanie nasion u poliploidalnych form *Trifolium repens* L., Hod. Rośl. Aklim. i Nasienn. 12: 423—435.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1970, Studia embriologiczne nad poliploidalnymi formami *Trifolium repens* L., (w druku).
- Bleier H., 1925, Chromosomenzahlen und Kernvolumina in der Gattung *Trifolium*, Ber. Deut. 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.
- Castetter E. F., 1925, Studies on the comparative cytology of the annual and biennial varieties of *Melilotus alba*, Amer. Jour. of Bot. 12: 270—286.
- Damisch W., 1963, Über den Einfluss biologischer Faktoren auf den Samenanatz bei Rotklee, Biol. Zentralbl.: 82.
- Evans A. M., 1955, The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne, New. Phytol. 54: 149—162.
- Faar C. H., Cell division by furrowing in *Magnolia*, Amer. Jour. of Bot. 5: 379—395.
- Ferreira de Almeida J. K., 1957, Trevos autotetra ploidés, I. O caso de *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveoleus* (Willd). Dinsm., Agron. Lusitana 19: 127—144.
- Johansen D. A., 1950, Plant Embryology. Embryogeny of the Spermatophyta, Waltham Maas U.S.A. 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 rödklover, Sver. Utsäd. Tidskr. 50: 115—124.
- Levan A., 1942, Plant breeding by induction of polyploid and some results in clover, Hereditas 28: 245.
- Löve A., Löve D., 1961, Chromosome numbers of central and northwest European Plant Species, Operat Bot. A Soc. Bot. Lundens.
- Łączyńska-Hulewicz T., 1957, Badania nad sztucznymi poliploidami. Cz. I., Roczn. Nauk. Roln. 75-A-3: 291—338.
- Łączyńska-Hulewicz T., 1965, Crossing experiments among cultivated clover specie (*Trifolium pratense*, *T. hybridum* and *T. repens*), Genet. Pol. 6: 1—4.
- Mackiewicz H. O., 1958, Badania nad di- i tetraploidalną koniczyną szwedzką (*Trifolium hybridum*), Roczn. Nauk. Roln. 79-A-2: 677—688.
- Mackiewicz H. O., 1963, Studies on di- and tetraploid alsike clover (*Trifolium hybridum*) Part. I. Morphology and anatomy of vegetative organs, Gen. Pol. 4: 121—138.

- Mackiewicz H. O., 1965, Studies on di- and tetraploid alsike clover (*Trifolium hybridum*) Part II. Flower morphology and the problem of fertility, Gen. Pol. 6: 41—42.
- Maheshwari P., 1950, Embryology of Angiosperms, Mc. Grew, Hool. Book Comp. Inc. New York, Toronto, London.
- Martin J. N., 1914, Comparative morphology of some *Leguminosae*, Bot. Gaz. 58: 154—167.
- Mützing A., Prakken R., 1940, The mode of chromosome pairing in *Phleum* twins 63 chromosomes and its cytogenetic consequences, Hereditas 26: 463—501.
- Poljakowa G. F., 1956, O morfologicznych i funkcjonalnych izmienieniach elementów zarodkowego mieszkaka, Wiestnik Leningradskiego Univ. Nr 21.
- Poljakowa G. F., Sołomina N., 1952, Citoembriologiczneskoje isledowanije krasnego klewiera — *Trifolium pratense* L. w swiazi z zadacziej powyszienija jego produktiwneste w leningradskoj oblasti, Wiestni Leningradskiego Univ. Nr 4.
- Powilajtis B., Boyes J. W., 1959, Embryosac production in relation to seed yields of diploid Dollard red clover, Can. Journ. of Plant Sc. 39: 364—374.
- Schürhoff P. N., 1923, Zur Apogamie von *Calycanthus*, Flora 116: 73—84.
- Starzycki St., 1959, Zmienność mieszańców koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z koniczyną czerwoną (*Trifolium pratense* L.), Hod. Rośl. Aklim. i Nasien. 3: 277—319.
- Starzycki St., 1961, Badania nad mieszańcami międzygatunkowymi koniczyn *Trifolium repens* L. × *Trifolium pratense* L., Hod. Rośl. Aklim. i Nasienn. 5: 285—330.
- Tahara M., 1915, Cytological Studies on *Chrysanthemum*, Bot. Gaz. Tokyo 28: 483—494.
- Tahara M., 1921, Cytologische Studies an einigen Kompositen, Jour. of the College of Sc. Imp. Univ. of Tokyo 43 Art. 7: 1—53.
- Yates J. J., Britton N. H., 1952, Cytological studies of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.), Austr. Journ. of Agric., Res. 3: 300—304.