Studia cyto-embriologiczne di- i tetraploidalnych form *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk.

Embriological studies on di- and tetraploid form *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk.

K. BIJOK, St. GÓRAL

WSTĘP

Dzkie formy koniczyny łąkowej *Trifolium pratense* var. *spontaneum* Willk. zawierają ogromne bogactwo typów, które mogą stanowić cenny materiał hodowlany dla tworzenia nowych odmian tego gatunku. Znajdują się wśród nich bardzo wczesne typy jare oraz późno kwitnące i ozieme. Jednoroczne i żyjące kilka lat. Typy płozące, zbliżone swoim pokrojem do koniczyny białej oraz zupełnie wyprostowane, bardzo podobne do kulturalnych form siewnych. Spośród wielu cech jedną z najbardziej cennych dla hodowców tego gatunku jest znaczna zimotrwałość dzikich ekotypów, którą potwierdzili swoimi pracami Sjøseth (1959) i Wexelsen (1966).

Wstępne badania dzikich ekotypów koniczyny łąkowej zebranej w północno-wschodnich rejonach Polski wykazały, że pod względem liczby chromosomów i ich morfologii formy te nie różnią się od czerwonej koniczyny siewnej (Góral, Bijok 1970). Również obszerne badania Wexelsena i Aastveita (1967) nad dzikimi ekotypami z kilku rejonów Norwegii wykazały, że nie istnieje bariera utrudniająca ich krzyżowanie z odmianami uprawnymi. Stąd autorzy ci wyrażają pogląd, iż nie ma podstaw, aby dziko rosnące koniczyny zaliczać do odrębnych grup systematycznych.

Poliploidyzacja uprawnej koniczyny czerwonej, jak to stwierdziło wielu autorów, podnosi jej bujność wegetatywną, przy jednoczesnym obniżeniu płodności. Tetraploidy uzyskane w Katedrze Genetyki WSR w Olsztynie, drogą kolchicynowania dzikich ekotypów łąkowych, wykazywały się korzystnymi zmianami pod względem budowy części wegetatywnych, ale jednocześnie słabiej osadzały nasiona w porównaniu do swoich form wyjściowych, aczkolwiek stopień zawiązywania nasion w ich owocostanach był wyższy aniżeli u tetraploidów wyhodowanych z odmian uprawnych. Celowe było wobec tego przebadanie embriologii u tych form dla określenia przyczyn ich obniżonej płodności.

MATERIAŁ I METODY

Badania embriologiczne prowadzone były na ekotypach *T. pratense* var. *spontaneum* Willk. zebranych ze stanowisk naturalnych w województwach: warszawskim, olsztyńskim i białostockim oraz formach tetraploidalnych uzyskanych działaniem 2% roztworu wodnego kolchicyny na stożki wzrostu siewek, materiału wyjściowego ze stanowisk naturalnych.

Materiał zebrano w postaci pączków o różnym stopniu rozwoju w 1967 r. z poletek doświadczalnych Katedry Genetyki Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie.

Zebrany materiał utrwalony w 50% utrwalaczu Nawaszyna zatopiony został w parafinie przy 52°C i pokrojony na mikrotomie na skrawki grubości 15μ . Preparaty były barwione 1% fioletem gencjanowym i różnicowane w roztworze fenolu w ksylenie w stosunku 1:3.

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

LICZBY CHROMOSOMÓW

Liczbę chromosomów $2n = 14$ u formy diploidalnej ze stanowisk naturalnych i formy tetraploidalnej *T. pratense* var. *spontaneum* $2n = 28$, uzyskanej na drodze podwojenia liczby chromosomów *T. pratense* ze stanowisk naturalnych, badano w metafazach somatycznych stożków wzrostu korzonków (Bijok, Góral 1970). Wyniki powyższe zostały

Rys. 1. Biwalenty z metafazy pierwszego podziału meiotycznego komórek macierzystych pyłku formy diploidalnej *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$). ($\times 2000$)

Figs. 1. Bivalents from first metaphase in P.M.C's diploid form *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$). ($\times 2000$)

Rys. 2. Biwalenty z metafazy pierwszego podziału meiotycznego komórek macierzystych pyłku formy tetraploidalnej *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$). ($\times 2000$).

Figs. 2. Bivalents from first metaphase in P.M.C's tetraploid form *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$). ($\times 2000$)

potwierdzone w obserwacji podziału mejotycznego w komórkach macierzystych pyłku (rys. 7 - 9, 12, 22 - 24, 27). W badaniach tych stwierdzono dla formy diploidalnej $n = 7$ (rys. 1), a dla formy tetraploidalnej $n = 14$ (rys. 2) chromosomów.

U obu form, zarówno di-, jak i tetraploidalnej chromosomy koniugują w postaci biwalentów. Biwalenty obu form różniły się co do budowy morfologicznej; biwalenty formy tetraploidalnej wykazywały większą liczbę chiazm i silniejszy stopień terminalizacji niż biwalenty formy diploidalnej — wyjściowej dla formy tetraploidalnej (rys. 1, 2).

OBSERWACJE NAD ROZWOJEM PYLNIKA

1. Topografia pylnika

Pylniki już w młodym stadium rozwoju posiadały cztery komory pylnikowe, wypełnione ściśle do siebie przylegającymi komórkami macierzystymi pyłku. Liczba ich na przekroju poprzecznym mieści się w granicach u formy diploidalnej od 4 do 5, a u formy tetraploidalnej od 5 do 6 komórek.

Rys. 3, 4. Komórki warstwy tapetum formy diploidalnej *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$)

3a — komórki tapetum w stadium premeiotycznym komórek macierzystych pyłku; 3b — komórki archesporialne pyłku; 4 — degenerujące komórki tapetum ($\times 2000$)

Figs. 3, 4. The cells of the tapetal layer of the diploid form of *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$)

3a — tapetal cells at the premeiotic stage of pollen mother cells; 3b — archesporial pollen mother cells; 4 — degenerated tapetal cells ($\times 2000$)

W tym stadium rozwoju, podobnie jak u *T. repens* i *T. hybridum*, w ścianie pylnika występowały cztery warstwy komórek, a mianowicie: skórka, warstwa włóknista, warstwa zanikająca i warstwa tapetum.

2. Tapetum

Komórki warstwy tapetum były wyróżnicowane w stadium premejo-
tycznym komórek macierzystych pyłku. W tym czasie komórki tapetum
posiadały kształt prawie kwadratowy, a wewnątrz ich wypełniała cyto-
plazma, w której widoczne było wyraźnie barwiące się jądro komórko-
we (rys. 3, 5).

Rys. 5, 6. Komórki warstwy tapetum formy tetraploidalnej *Trifolium pratense*
var. *spontaneum* ($2n = 28$).

5a — komórki tapetum w stadium premejo-tycznym komórek macierzystych pyłku; 5b —
komórki macierzyste pyłku; 6 — degenerujące komórki tapetum ($\times 2000$)

Figs. 5, 6. The cells of the tapetal layer of the tetraploid form of *Trifolium pratense*
var. *spontaneum*

5a — tapetal cells at the premeiotic stage of pollen mother cells; 5b — pollen mother cells;
6 — degenerated tapetal cells ($\times 2000$)

W czasie prowadzonych badań nie obserwowano w żadnym przy-
padku podziału jąder w komórkach tapetum, ani ich zlewania się,
względnie zwiększania się liczby chromosomów na drodze endomitozy.
Można z tego wnioskować, że jądra komórek tapetum posiadają u formy
diploidalnej $2n = 14$, a u formy tetraploidalnej $2n = 28$ chromosomów.

W okresie dojrzewania ziarn pyłku obserwowano postępujący proces degeneracji komórek tapetum, który przebiegał podobnie jak to obserwowano u *T. repens* i *T. hybridum* (Bijok, Góral, Góral 1970, 1970) (rys. 4-6).

3. Mikrosporogeneza

U badanych form *T. pratense* var. *spontaneum* komórki macierzyste pyłku w komorach pylnikowych występowały zawsze w tym samym stadium podziałowym. Komórki macierzyste pyłku różniły się wyraźnie swym wyglądem od otaczających je komórek warstwy tapetum.

Obserwacje podziałów mejotycznych przeprowadzono od stadium diakinezy. Komórki macierzyste pyłku w tym stadium były luźno ułożone w komorach pylnikowych.

W stadium diakinezy u formy diploidalnej *T. pratense* var. *spontaneum* ze stanowisk naturalnych stwierdzono 7 biwalentów (rys. 7), natomiast u formy eksperymentalnej — tetraploidalnej tego gatunku występowały również biwalenty, ale w liczbie podwójnej, czyli w ilości 14 par (rys. 22).

U obu form koniugujące chromosomy w tym stadium posiadały zawsze pewne charakterystyczne i stałe konfiguracje (rys. 7, 22).

W stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego występowały również u obu badanych form biwalenty w liczbie $n = 7$ i $n = 14$ (rys. 1, 2, 7-9, 22-24). Płytki metafazowe w tym stadium ułożone były w środku komórki macierzystej pyłku lub bardzo rzadko na jej obwodzie (rys. 8, 23). Po normalnie przebiegającej kongresji chromosomów, z jednej i drugiej strony płytki metafazowej występowało bardzo wyraźnie wykształcone wrzeciono kariokinetyczne (rys. 8, 23).

Stadium anafazy pierwszego podziału mejotycznego o obu form przebiegało normalnie. Nie występowały w tym stadium zaburzenia, a rozchodzenie się chromosomów na bieguny było zsynchronizowane (rys. 10, 25). Pomiedzy rozchodzącymi się na bieguny grupami chromosomów występował fragmoplast, który utrzymywał się do chwili powstania dwóch jąder potomnych (rys. 10, 11, 25, 26).

W stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego, obie płytki chromosomowe i obydwa wrzeciona kariokinetyczne zarówno u formy di-, jak i tetraploidalnej układały się prostopadle, rzadziej równolegle do siebie (rys. 12, 27).

W stadium anafazy drugiego podziału mejotycznego, podobnie jak i w stadium anafazy pierwszego podziału mejotycznego, rozchodzenie się chromosomów na bieguny przebiegało zsynchronizowanie (rys. 13). I w tym stadium pomiędzy rozchodzącymi się na bieguny chromosomami były widoczne wyraźnie fragmoplasty (rys. 13).

W stadium telofazy drugiego podziału mejotycznego u obu form

Rys. 7—21

w komórkach macierzystych pyłku widoczne były cztery jądra, a pomiędzy nimi sześć fragmoplastów (rys. 14, 28).

Powstawanie tetrady mikrospor odbywało się u obu badanych form według podziału równoczesnego, który uważany jest za charakterystyczny dla *Dicotyledones* (rys. 15, 16, 29, 30).

Komórki tetrady mikrospor zawierały duże jądro o luźnej strukturze (rys. 16, 30).

4. Rozwój mikrospor

Pierwotne ziarna pyłku po wydostaniu się z komórki macierzystej pyłku początkowo otoczone były pojedynczą błoną — intyną (rys. 17, 31). W dalszym ich rozwoju wykształciła się druga błona — egzyna (rys. 18 - 25), która jak się wydaje powstała przy współudziale komórek tapetum (Maheshwari 1950).

W egzynie były widoczne u formy diploidalnej, sięgające do intyny trzy (rys. 18 - 21), natomiast u formy tetraploidalnej *T. pratense* cztery zagłębienia — pory (rys. 32 - 35); ich liczba była trudna do ustalenia.

Młode ziarna pyłku posiadały duże, o dość luźnej strukturze jądro komórkowe, które było jednocześnie zepchnięte w stronę błony komórkowej przez centralnie umieszczoną wodniczkę (rys. 18, 19, 32, 33). Podział mitotyczny tego jądra (rys. 19, 33) doprowadził do wykształcenia się w ziarnach pyłku dwóch jąder: większego o luźnej strukturze — wegetatywnego i mniejszego o zwartej strukturze — generatywnego (rys. 20, 34).

Dojrzałe ziarna pyłku obu badanych form *T. pratense* posiadały trzy jądra: wegetatywne i dwa jądra plemnikowe (rys. 21, 35); ostatnie, podobnie jak jądro generatywne, były otoczone cienką warstwą własnej cytoplazmy (rys. 20, 21, 34, 35). W tym okresie następowało pękanie ścian pylników i wysypywanie się pyłku z komór pylnikowych.

Rys. 7-21. Rozwój pyłku u diploidalnej formy *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$)

7 — diakineza; 8 — metafaza pierwszego podziału mejozy; 9 — metafaza pierwszego podziału mejozy widoczna z góry; 10, 11 — anafaza i telofaza pierwszego podziału mejozy; 12 — metafaza drugiego podziału mejozy; 13, 14 — anafaza i telofaza drugiego podziału mejozy; 15, 16 — rozwój tetrady mikrospor, 17, 18 — pierwotne ziarno pyłku; 19 — podział mitotyczny jądra w pierwotnym ziarnie pyłku; 20 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym; 21 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 2000$)

Figs. 7-21. Development of pollen in diploid form of *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$)

7 — diakinesis, 8 — first metaphase in P.M.C's.; 9 — first metaphase in P.M.C's.; — Polar view; 10, 11 — first anaphase and telophase in P.M.C's.; 12 — second metaphase in P.M.C's.; 13, 14 — second anaphase and telophase in P.M.C's.; 15, 16 — formation of microspore tetrads; 17, 18 — original pollen grain; 19 — nucleus of the pollen grain in metaphase stage; 20 — pollen grain with vegetative and generative nucleus; 21 — pollen grain with vegetative and two sperm nuclei ($\times 2000$)

Rys. 22—35

Wielkość ziarn pyłku obu badanych form *T. pratense* była zróżnicowana, a mianowicie: u formy diploidalnej średnia długość 100 badanych ziarn pyłku wynosiła 17,40 mikrona, zaś szerokość 13,25 mikrona. U formy tetraploidalnej natomiast średnia długość 100 badanych ziarn pyłku wynosiła 21,78 mikrona, a szerokość 15,44 mikrona (rys. 57, 58).

ZALĄŻEK

1. Topografia zalążka

Zalążek u badanych form *T. pratense* był amfitropowy, cienkoośrodkowy o podwójnym integumencie. Należy dodać, że integument wewnętrzny posiadał tylko dwie warstwy komórek.

Jednokomorowa zalążnia mieściła zawsze tylko 2 zalążki, przy czym pod względem wielkości nie były zróżnicowane.

Ośrodek występował w postaci jednej warstwy komórek tworząc epidermis. Komórki epidermy ośrodka na podłużnym przekroju zalążka (rys. 36, 45) były kształtu mniej lub więcej prostokątnego, a od stadium czterojądrowego woreczka zalążkowego (rys. 40, 49) spłaszczone i wydłużone. Od tego stadium następowała degeneracja komórek epidermy ośrodka, która całkowicie dochodziła do skutku w stadium ośmiejądrowego woreczka zalążkowego (rys. 41, 50).

2. Archesor

Archesor formy di- i tetraploidalnej *T. pratense* był wielokomórkowy (rys. 36, 45). Komórki jego w okresie podziałów mejotycznych rozrastały się na długość w kierunku dłuższej osi zalążka i wciskały się pomiędzy komórki chalazy.

Rys. 22 - 35. Rozwój pyłku u eksperymentalnej tetraploidalnej formy *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$)

22 — diakineza; 23 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego; 24 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego, widoczna z góry; 25, 26 — anafaza i telofaza pierwszego podziału mejotycznego; 27 — metafaza drugiego podziału mejotycznego; 28 — telofaza drugiego podziału mejotycznego; 29, 30 — rozwój tetrady mikrospor; 31, 32 — pierwotne ziarno pyłku; 33 — podział mitotyczny jądra w pierwotnym ziarnie pyłku; 34 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym; 35 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1000$)

Figs. 22 - 35. Development of pollen in experimental tetraploid form of *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$)

22 — diakinesis; 23 — first metaphase in P.M.C's.; 24 — first metaphase in P.M.C's. — Polar view; 25, 26 — first anaphase and telophase in P.M.C's.; 27 — second metaphase in P.M.C's.; 28 — second telophase in P.M.C's.; 29, 30 — formation of microspore tetrads; 31, 32 — original pollen grain; 33 — nucleus of the pollen grain in metaphase stage; 34 — pollen grain with vegetative and generative nucleus; 35 — pollen grain with vegetative and two sperm nuclei ($\times 1000$)

Rys. 36-44. Rozwój woreczka zalążkowego u formy diploidalnej *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$)

36 — archespor wielokomórkowy; 37 — tetrady makrospor; 38 — jednojądrowy woreczek zalążkowy z zanikającymi makrosporami od strony okienka; 39 — dwujądrowy woreczek zalążkowy; 40 — czterojądrowy woreczek zalążkowy; 41 — ośmiojądrowy woreczek zalążkowy; 42 — woreczek zalążkowy z aparatem jajowym, jądrami biegunowymi i antypodami; 43 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego; 44 — chalazalna część woreczka zalążkowego z degenerującymi trzema antypodami ($\times 300$)

Fig. 36-44. Development of embryo sac in diploid form of *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($n = 7$, $2n = 14$)

36 — multicellular archespor; 37 — tetrads of megaspores; 38 — mononucleate embryo sac; 39 — binucleate embryo sac; 40 — four-nucleate embryo sac; 41 — eight-nucleate embryo sac; 42 — embryo sac with egg apparatus, polar nuclei and antipodal cells; 43 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary embryo sac nucleus; 44 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells — degenerate ($\times 300$)

3. Makrosporigeneza

Komórki archesporu obu form były kształtu początkowo nieco wydłużonego z jądrami o bardzo luźnej strukturze; przylegały do siebie. Przekształcały się one bezpośrednio w komórki macierzyste makrospor, bez oddzielania komórek przykrywkowych (rys. 36, 45).

W czasie podziałów mejotycznych komórki macierzyste makrospor nie posiadały uprzedniej zwartości ułożenia. W obrębie jednego zalążka, komórki macierzyste makrospor znajdowały się w różnych stadiach podziałów mejotycznych (rys. 37, 38, 46, 47). Należy zaznaczyć, że najszybciej podziały mejotyczne zachodziły w komórce macierzystej makrospor najbliższej okienka (rys. 37, 46). Po pierwszym i drugim podziale mejotycznym w zalążkach obu badanych form występowało kilka tetrad makrospor (rys. 37, 38, 46, 47). Były one ułożone mniej lub więcej liniowo, wzdłuż podłużnej osi zalążka.

4. Rozwój woreczka zalążkowego

W rozwoju woreczka zalążkowego udział brała tylko jedna tetrada makrospor najbliższa okienka, inne natomiast były spychane na boki ośrodka, względnie rzadko w kierunku chalazy, gdzie degenerowały (rys. 38, 47).

Woreczek zalążkowy rozwijał się z makrospory chalazalnej, tetrad makrospor najbliższej okienka. Trzy makrospory od strony okienka tej tetrad makrospor degenerowały (rys. 38 - 40, 47 - 49). Szczątki ich występowały jeszcze w stadium czterojądrowego woreczka zalążkowego (rys. 40, 49) w postaci ciemno zabarwionej masy.

Makrospora dająca początek woreczkowi zalążkowemu silnie się wydłużała (rys. 38, 47), a jądro jej dzieliło się trzykrotnie podziałem mitotycznym. Obserwowano woreczki zalążkowe dwu-, cztero- i ośmiojądrowe. W woreczkach dwu- cztero- i ośmiojądrowych pomiędzy jądrami od strony okienka a jądrami ułożonymi od strony chalazy wykształcona była wodniczka (rys. 39 - 41, 48 - 50).

Woreczek zalążkowy obu badanych form *T. pratense* był ośmiojądrowy typu monosporialnego (rys. 42 - 44, 51 - 53).

5. Budowa dojrzałego woreczka zalążkowego

W jednym i drugim przypadku czyli zarówno u formy di-, jak i tetraploidalnej *T. pratense*, woreczek zalążkowy posiadał typową budowę (rys. 42 - 44, 51 - 53) i zawierał: aparat jajowy, w skład którego wchodziła komórka jajowa i dwie synergidy (rys. 42, 43, 51, 52), wtórne jądro woreczka zalążkowego (rys. 43, 52), powstałe z połączenia dwóch jąder biegunowych (rys. 42, 51) i antypody w liczbie trzech komórek (rys. 42, 44, 51, 53).

Rys. 45 - 53. Rozwój woreczka zalążkowego u eksperymentalnej tetraploidalnej formy *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$)

45 — archespor wielokomórkowy; 46 — tetrady makrospor; 47 — jednojądrowy woreczek zalążkowy z zanikającymi tetradami od strony okienka; 48 — dwujądrowy woreczek zalążkowy; 49 — czterojądrowy woreczek zalążkowy; 50 — ośmiojądrowy woreczek zalążkowy; 51 — woreczek zalążkowy z aparatem jajowym, jądrami biegunowymi i antypodami; 52 — mikropylarna część woreczka zalążkowego z aparatem jajowym i wtórnym jądrem woreczka zalążkowego; 53 — chalazalna część woreczka zalążkowego z degenerującymi trzema antypodami ($\times 300$)

54

55

Rys. 54. Wykresy średnic jąder komórkowych dermatogenu w mikronach
1 — forma diploidalna *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — eksperymentalna forma tetraploidalna *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Fig. 54. Graphs of cell nuclei dermatogen in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — experimental tetraploid form of *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Rys. 55. Wykresy średnic jąder komórkowych peryblemu w mikronach
1 — forma diploidalna *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — eksperymentalna forma tetraploidalna *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Fig. 55. Graphs of cell nuclei peryblemu in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* ($2n = 14$); 2 — experimental tetraploid form *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Należy szczególnie podkreślić, że zarówno u formy di, jak i tetraploidalnej *T. pratense* woreczki zalążkowe wykształcały się w obu zalążkach. Nie stwierdzono zalążków, w których by występowały zdegenerowane lub niecałkowicie rozwinięte woreczki zalążkowe.

W zalążkach wykształcał się zawsze tylko jeden woreczek zalążkowy.

Fig. 45 - 53. Development of embryo sac in experimental tetraploid form of *Trifolium pratense* var. *spontaneum* ($n = 14$, $2n = 28$)

45 — multicellular archesporium; 46 — tetrads of megaspores; 47 — mononucleate embryo sac; 48 — binucleate embryo sac; 49 — four-nucleate embryo sac; 50 — eight-nucleate embryo sac; 51 — embryo sac with egg apparatus, polar nuclei and antipodal cells; 52 — micropylar part of embryo sac with egg apparatus and secondary embryo sac nucleus; 53 — chalazal part of embryo sac with antipodal cells — degenerate ($\times 300$)

56

57

Rys. 56. Wykresy długości aparatów szparkowych w mikronach

1 — forma diploidalna *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — eksperymentalna forma tetraploidalna *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Fig. 56. Graphs of the stomata lenght in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — experimental tetraploid form of *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Rys. 57. Wykresy szerokości ziarn pyłku w mikronach

1 — forma diploidalna *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk.; 2 — eksperymentalna forma tetraploidalna *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Fig. 57. Graphs of the width cell nuclei pollen grain in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — experimental tetraploid form of *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

58

Fig. 58. Graphs of the lenght nuclei pollen grain in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — experimental forma tetraploidalna *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

Fig. 58. Graphs of the lenght nuclei pollen grain in microns

1 — diploid form of *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. ($2n = 14$); 2 — experimental tatraploid form of *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n = 28$)

ANALIZA CECH ANATOMICZNO-MORFOLOGICZNYCH
FORMY DI- I TETRAPLOIDALNEJ *T. PRATENSE*

Analiza zestawionych na wykresach rys. 54-58 pewnych cech anatomicznych, jak i poprzednio przedstawione (Bijok, Góral 1970) badania morfologiczne wykazują całkowitą zgodność z ogólnie przyjętymi zasadami dotyczącymi różnic w cechach anatomiczno-morfologicznych form poliploidalnych i z ich formami wyjściowymi.

DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy było opracowanie pod względem cytologiczno-embriologicznym formy diploidalnej *T. pratense* var. *spontaneum* z terenów północno-wschodniej Polski i jej formy tetraploidalnej uzyskanej na drodze eksperymentalnej. Jednocześnie praca niniejsza miała na celu znalezienie przyczyn zmniejszonej płodności kolchipsoidów *T. pratense* w porównaniu z materiałem wyjściowym zebrany z stanowisk naturalnych.

Przeprowadzone badania potwierdziły ustaloną poprzednio dla formy diploidalnej liczbę $2n=14$ i tetraploida eksperymentalnego *T. pratense* $2n=28$ chromosomów (Bijok, Góral, 1970) i są zgodne z liczbami $n=7$ i $n=14$ chromosomów obserwowanymi w podziale mejotycznym komórek macierzystych pyłku (rys. 1, 2, 7-9, 12, 22-24, 27).

Chromosomy obu badanych form w pierwszym podziale mejotycznym koniugowały ze sobą tylko w postaci biwalentów (rys. 1, 2, 7, 22). Nie spotkano w żadnym przypadku w czasie prowadzonych badań występowania u formy eksperymentalnej uniwalentów, względnie tetrawalentów. Szczegółowa analiza biwalentów u obu badanych form wykazała, że biwalenty tetraploida eksperymentalnego *T. pratense* ($2n=28$) posiadały większą liczbę chiazmy i silniejszy stopień terminalizacji niż biwalenty formy wyjściowej *T. pratense* var. *spontaneum* ($2n=14$) ze stanowisk naturalnych (rys. 1, 2).

U tetraploida *T. pratense* ze stanowisk naturalnych w USA i Nowej Zelandii Atwood i Hill (1940) stwierdzili w podziale mejotycznym poza biwalentami wyjątkowo dwa uniwalenty. Występowanie uniwalentów, biwalentów i tetrawalentów obserwowali u eksperymentalnej formy autotektoploidalnej ($2n=64$) *T. repens* Levan (1942), Atwood (1944), Brewbaker, Keim (1953), Evans (1955) i Wexelsen (1928). Kazubowska-Mackiewicz (1964) u diploidalnej *T. pratense* w podziale mejotycznym obserwowała tylko biwalenty, natomiast u formy tetraploidalnej *T. pratense* obserwowała tetrawalenty i uniwalenty powiązane w postaci łańcuszków. U innych gatunków poliploidalnych rodzaju *Trifolium* występowanie uni-, bi- i tetrawalentów stwierdzili Levan (1940) i Yates, Britton (1952).

Müntzing, Prakken (1940) u gatunków z rodzaju *Phlenum* i Bijok (1964, 1965, 1965) u tetraploidalnego *Chrysanthemum corymbosum* ze stanowisk naturalnych oraz eksperymentalnego tetraploida *Ch. subcorymbosum* stwierdzili występowanie w podziale mejotycznym jedynie biwalentów.

Podział mejotyczny u badanych form miał przebieg normalny, stąd nie obserwowano u nich występowania zdegenerowanego pyłku (rys. 7-35). Podobny przebieg podziału mejotycznego i brak zdegenerowanego pyłku obserwowali u *T. repens* i *T. hybridum* ze stanowisk naturalnych północno-wschodniej Polski, jak i ich sztucznych poliploidów Bijok, Góral, Góral (1970, 1970). Bleier (1925), Kazubowska-Mackiewicz (1964) u *T. pratense* i Ferreira de Almeida (1957) u *T. resupinatum*, obserwowali w komorach pylnikowych zdegenerowany pyłek. Powodem tego były zaburzenia w czasie podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku w postaci niesynchronizowanego rozchodzenia się chromosomów na bieguny (Kazubowska-Mackiewicz 1964) lub przez wykształcanie się jednobiegunowego wrzeciona kariokinetycznego (Bleier 1925).

Zarówno badania własne, jak i badania Martina (1914), Poliakowa, Sołomina (1925) i Kazubowskiej-Mackiewicz (1964) wykazały występowanie u *T. pratense* wielokomórkowego archesporu (rys. 36, 45). Wielokomórkowy archespor stwierdzili u *T. repens* i *T. hybridum* Martin (1914), Poliakowa, Sołomina (1952), Kazubowska-Mackiewicz (1964) i Bijok, Góral, Góral (1970). U *T. hybridum* z terenów północno-wschodniej Polski Bijok, Góral, Góral (1970) stwierdzili archespor dwukomórkowy.

U *T. pratense* ze stanowisk naturalnych północno-wschodniej Polski, jak i u jej eksperymentalnej autotetraploidalnej formy podziały mejotyczne zachodziły we wszystkich komórkach macierzystych makrospor (rys. 36-38, 47-54).

Podobne wyniki osiągnęli Bijok, Góral, Góral 1970, 1970) u *T. hybridum* i *T. repens* ze stanowisk naturalnych północno-wschodniej Polski jak i u ich form autopoloidalnych.

Z licznych tetrad makrospor, woreczek zalążkowy tworzył się u badanych roślin z chalazalnej makrospory, tetrazy najbliższej okienka (rys. 38, 47). Pozostałe tetrazy makrospor obumierały (rys. 38-40, 47-49). Martin (1914), Poliakowa (1956), Povilajtis, Boyes (1960) i Kazubowska-Mackiewicz (1964) stwierdzili zarówno u *T. pratense*, jak i u *T. hybridum* i *T. repens* oraz ich form poliploidalnych, rozwój tylko jednej komórki macierzystej woreczka zalążkowego.

Woreczek zalążkowy u badanych form *T. pratense* był ośmiojądrowy typu monosporialnego (rys. 41-44, 50-53). Podobny typ woreczka za-

łązkowego stwierdzili u *T. pratense*, *T. hybridum* i *T. repens* Martin (1914), Poliakowa (1956), Povilajtis, Boyes (1960), Kazubowska-Mackiewicz (1964) i Bijok, Góral, Góral (1970, 1970).

Przeprowadzone badania u obu form *T. pratense* wykazały, że antypody w okresie dojrzewania woreczka zalążkowego, a mianowicie w czasie łączenia się we wtórne jądro woreczka zalążkowego jąder biegunowych degenerowały (rys. 44, 53). Potwierdziły to również badania prowadzone u *T. pratense*, *T. hybridum* i *T. repens* przez Martina (1914), Kazubowska-Mackiewicz (1964) i Bijoka, Góralowej, Górala (1970, 1970).

U obu badanych form *T. pratense* nie obserwowano w żadnym przypadku degenerowania woreczka zalążkowego. Podobne zjawisko stwierdzili Bijok, Góral, Góral (1970, 1970) u *T. hybridum* i *T. repens*. Povilajtis, Boyes (1959), Damisch (1963) i Kazubowska-Mackiewicz (1964) stwierdzili u *T. pratense* występowanie zalążków z zdegenerowanymi woreczkami zalążkowymi, a często nawet zalążki pozbawione woreczków zalążkowych.

Zalążnia u badanych form *T. pratense* podobnie, jak u *T. hybridum* i *T. repens* była jednokomorowa (Kazubowska-Mackiewicz 1964), (Bijok, Góral, Góral 1970, 1970).

Zalążki obu form *T. pratense* w liczbie zawsze dwóch były jednakowych rozmiarów podobnie jak u *T. hybridum* i *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970, 1970). Kazubowska-Mackiewicz (1964) u *T. pratense* obserwowała zróżnicowanie co do wielkości pomiędzy zalążkami w zalążni.

Przeprowadzone badania u *T. pratense* var. *spontaneum*, podobnie jak to stwierdzono u *T. hybridum* i *T. repens* (Bijok, Góral, Góral 1970a, b), nie wskazują na to, aby w rozwoju embriologicznym *T. pratense* do czasu wykształcenia się dojrzałego pyłku i woreczka zalążkowego istniały przyczyny mogące wpłynąć na obniżoną płodność ich poliploidów. Przyczyny tego mogą tkwić w procesie zapłodnienia, rozwoju zarodka i bielma. Zagadnienie to będzie przedmiotem dalszych badań.

STRESZCZENIE

W toku badań potwierdzono liczby $n = 7$, $2n = 14$ u formy diploidalnej ze stanowisk naturalnych północno-wschodniej Polski *T. pratense* L. var. *spontaneum* Willk. (rys. 1) i $n = 14$, $2n = 28$ u sztucznego tetraploida *T. pratense* var. *spontaneum* (rys. 2).

U formy diploidalnej i u sztucznego tetraploida *T. pratense* w diakinezie i metafazie pierwszego podziału mejotycznego występowały zawsze biwalenty (rys. 1, 2, 7-9, 12, 22-24, 27). Biwalenty formy tetraploidalnej *T. pratense* posiadały wyższą liczbę chiazmy i silniejszy stopień terminalizacji od biwalentów formy wyjściowej *T. pratense* ze stanowisk naturalnych północno-wschodniej Polski (rys. 1, 2).

Komórki tapetum obu badanych form były jednojądrowe, o jądrach diploidalnych, a tapetum było typu komórkowego (rys. 3 - 6).

Podziały mejotyczne w komórkach macierzystych pyłku zachodziły normalnie i stąd nie obserwowano zdegenerowanego pyłku. Dojrzałe ziarna pyłku były trójjądrowe i posiadały: duże jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe otoczone cienką warstwą własnej cytoplazmy (rys. 7 - 35).

Archospor badanych form *T. pratense* był wielokomórkowy (rys. 36, 45). Komórki archosporu przekształcały się bez oddzielania komórek przykrywkowych w komórki macierzyste makrospor. Podziały mejotyczne zachodziły we wszystkich komórkach macierzystych makrospor (rys. 37, 38, 46, 47). Makrospora chalazalna tetrady makrospor najbliższej okienka, dawała początek ośmiojądrowemu woreczkowi zalążkowemu typu monosporialnego (rys. 38 - 41, 46 - 50). Pozostałe tetrady makrospor obumierały (rys. 37, 38, 46, 47). Woreczek zalążkowy u obu badanych form posiadał typową budowę (rys. 42 - 44, 51 - 53).

Zalążnia obu form *T. pratense* była jednokomorowa i obejmowała zawsze tylko dwa zalążki. Zalążki posiadały jednakowe rozmiary.

Nie stwierdzono zalążków pozbawionych, względnie posiadających zdegenerowane woreczki zalążkowe.

Przeprowadzone badania embriologiczne nie wykazały przyczyn, które byłyby powodem obniżonej płodności u sztucznych tetraploidów *T. pratense*. Przyczyny tego zjawiska tkwią prawdopodobnie w procesie zapłodnienia, rozwoju zarodka, bielma i będą przedmiotem dalszych badań.

Katedra Genetyki WSR
w Olsztynie

(Wpłynęło dn. 25.1.1970 r.)

SUMMARY

As a result of this study the following chromosome numbers have been confirmed: $n = 7$, $2n = 14$ for the diploid form of *Trifolium pratense* L. var. *spontanum* Willk. (Fig. 1) taken from the natural stands in north-eastern Poland, and $n = 14$, $2n = 28$ for the experimental tetraploid of *T. pratense* var. *spontanum* (Fig. 2).

At diakinesis and metaphase of the first meiotic division always the bivalents are formed both in the diploid form and in the experimental tetraploid of *T. pratense* var. *spontanum* (Figs. 1, 2, 7 - 9, 22 - 24, 27). The bivalents of the tetraploid *T. pratense* are characterized by a larger number of chiasmata and a higher degree of terminalization than the bivalents the natural form of *T. pratense* L. var. *spontanum* Willk. (Figs. 1, 2).

The tapetal cells of the studied forms are uninucleate, their nuclei are diploid and the tapetum itself is of the cellular type (Figs. 3 - 6).

Meiotic division in the pollen mother cells are normal and no degenerate pollen is observed. The mature pollen grains are trinucleate and contain one large vegetative nucleus and the two sperm-nuclei surrounded with a thin layer the spermoderm of their cytoplasm (Figs. 7 - 35).

The archesporium of the studied forms of *T. pratense* is multicellular (Figs. 36 - 45). The archesporous cells undergo the transformation into macrospore mother cells without separation of covercells. Meiotic divisions take place in all macrospore mother cells (Figs. 37, 38, 46, 47). The chalazal macrospore of the tetrad of macro-

spores next to the micropyle is found to give the origin of the octonucleate embryo sac of the monosporial type (Figs. 38 - 41, 46 - 50). The remaining tetrads of macrospores break down (Figs. 37, 38, 46, 47). The embryo sac of both the studied forms is typical in structure (Figs. 42 - 44, 51 - 53).

The ovary in these two forms of *T. pratense* var. *spontaneum* is monocelled and it always contains only two ovules; they are of the same size.

No ovules deprived of embryo sacs or having them degenerated are found.

This embryological study has not accounted for the causes of a decreased fertility in experimental tetraploids of *T. pratense* var. *spontaneum*. The causes probably associated with the fertilization process and the development of embryo and endosperm, and they will make the object of further investigations.

LITERATURA

- Atwood S. S., Hill H. D., 1940, The regularity of meiosis in microsporocytes of *Trifolium repens*, Am. Journ. Bot. 27: 730 - 735.
- Atwood S. S., 1944, Colchicine-induced polyploids in white clover, Journ. Am. Sc. Agron. 36: 173 - 174.
- Bijok K., 1964, Studia cyto-embriologiczne nad gatunkami *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schur.) Beck. i *Ch. corymbosum* L., Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie, 18, 123 - 140.
- Bijok K., 1965, Badania cytogenetyczne nad gatunkami *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schur.) Beck. i *Ch. corymbosum* L., Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie 19: 297 - 345.
- Bijok K., 1965, Studia kariologiczne i embriologiczne nad tetraploidem eksperymentalnym, uzyskanym przez podwojenie liczby chromosomów *Chrysanthemum subcorymbosum* (Schur.) Beck., Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie 19: 213 - 235.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1970a, Badania embriologiczne di- i tetraploidalnych form *Trifolium hybridum* L., Acta Agrob. 23 (1): 279 - 295.
- Bijok K., Góral M., Góral St., 1970b, Studia embriologiczne nad poliploidalnymi formami *Trifolium repens* L., Acta Agrob. 23 (1): 259 - 277.
- 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 I. L., Keim W. F., 1953, A fertile interspecific hybrid in *Trifolium* (4n *T. repens* L. × 4n *T. nigrescens* Viv.), Am. Nat. 87: 323 - 326.
- Damisch W., 1963, Über den Einfluss biologischer Faktoren auf den Samenansatz 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.
- Ferreira de Almeida J. K., 1957, Trevos autotetraploides, I. O caso de *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveoleus* (Willd.) Dinsm., Agron. Lusitana 19: 127 - 144.
- Góral St., Bijok K., 1970, Wstępne badania ekotypów *Trifolium pratense* L. var. *spontaneum* Willk. pochodzących z północno-wschodnich rejonów Polski, Hod. Rośl. Aklim. i Nasien. (w druku).
- Johansen D. A., 1950, Plant Embryology. Embryogeny of the Spermatophyta, Waltham, Mass. 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 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.
- 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.
- Müntzing A., Prakken R., 1940, The mode of chromosome pairing in Phleum twins 63 chromosomes and its cytogenetic consequences, Hereditas 26: 463-501.
- Poliakowa G. F., 1956, O morfologiczeskich i funkcjonalnych izmienienijach elementow zarodyszego mieszka, Wiestnik Leningradskego Uniw. Nr. 21.
- Poliakowa G. F., Sołomina N., 1952, Citoembriologiczeskoje isledowanije krasnego klewiera — *Trifolium pratense* L. w swiazi z zadacziej powyszienija jego produktiwnoste w leningradskoj oblasti, Wiestni Leningradskego Uniw. Nr. 4.
- Povilaitis B., Boyes I. W., 1956, A cytological study of autotetraploid red clover, Am. Journ. Bot. 43: 166-174.
- Povilaitis B., Boyes I. W., 1959, Embryosac production in relation to seed yields of diploid Dollard red clover, Can. Jour. of Plant Sc. 39: 364-374.
- Sjoseth H., 1959, Studies on ice encasement in strains of red clover (*Trifolium pratense*) and timothy (*Phleum pratense*), Acta Agric. Scand. 9: 292-298.
- Schnarf K., 1929, Embryologie der Angiospermen, Berlin.
- Schnarf K., 1931, Vergleichende Embryologie der Angiospermen, Berlin.
- Schürhoff P. N., 1926, Die Zytologie der Blütenpflanzen, Stuttgart Verl. von Ferdinand Ecnke.
- Tischler G., 1950, Die Chromosomenzahlen der Gefäßpflanzen Mitteleuropas, Uitgeverij Dr W. Junk'S — Gravenhage.
- Yates I. I., Britton N. H., 1952, Cytological studies of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.), Austr. Journ. of Agric. Res., 3: 300-304.
- Wexelsen H., 1928, Chromosome numbers and morphology in *Trifolium*, Univ. Calif. Publ. Agri. Sci. 12: 355-376.
- Wexelsen H., Studies on wildgrowing populations of red clover *Trifolium pratense*, Acta Agr. Fennica 107: 30-43.
- Wexelsen H., Aastveit K., 1967, Variation in progenies derived from crosses between wildgrowing and cultivated Norwegian red clover, Sci. Reports Agric. Coll. Norway 46 (3): 1-20.