

Studia nad kariologią i rozwojem pyłku kilku odmian *Medicago sativa* L. Cz. I.

K. BIJOK, E. ADAMKIEWICZ, I L. GRYGORCZYK

Instytut Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdynia, ul. Czołgistów 46

Abstract:

K. Bijok, E. Adamkiewicz, L. Grygorczyk. *Institute of Biology, Gdańsk University, Gdynia, Czołgistów 46, Poland.* (Received: November 2, 1970).

Studies on karyology and pollen development in several varieties of Medicago sativa L. Part I.

At the stage of diakinesis and metaphase of the first meiotic division, conjugating chromosomes in the form of bivalents were always observed. At the pre-meiotic stage some of the mother pollen cells underwent degeneration (in 'Australian' var. 17% in 'Warmińska' 20%, in 'Kleszczewska' 23%, in 'Grimma' 30% and in 'Miechowska' 40%). In the degenerating mother pollen cells no meiotic division were observed. In the surviving mother pollen cells, meiotic division were found to be normal. The mature pollen grains were trinucleate.

WSTĘP

Medicago sativa L. i jej liczne odmiany stanowiła przedmiot zainteresowania pracy licznych kariologów i embriologów.

Poprzednio gatunek *M. sativa* był pod względem kariologicznym badany przez Eldersa (1926), Karpeczenko (cyt. Tischler 1927), Stählina (1928), Ghimpu (1928, 1929 a, b, 1930, 1941), Reevesa (1930), Freya (1930), Kawakami (1930), Tschechowa (1930, 1933), Coopera (1935, 1936, 1939), Coopera, Brinka, Albrechta (1937), Romanenko (1937), Senna (1938 b, Skovsteda (1939), Wipfa (1939), Sinskaya (1940, 1959a), Ledinghama (1940), Nilssona, Andersona (1941, 1943), Julena (1944), Frandsena (1945), Schelhorna (1947), Tome (1947), Moriya, Kondo (1950 b), Gruna (1951a), Lesinsa (1952, 1954 a, b, 1955, 1956 a, b, 1957, 1958), Evansa (1955), Fyfe (1957), Saunorisa (1957 a, b) i Sinskaya, Maleyeva (1959).

Badania nad rozwojem pyłku u tego gatunku i jego odmian prowadzili Reeves (1930), Brink, Cooper (1936), Grun (1951a) i Evans (1955). Również płodność różnych odmian *M. sativa* była przedmiotem licznych badań zarówno cyto-genetyków, jak i hodowców.

Zagadnienie płodności odmian *M. sativa* stanowi niezmiernie ważny problem w hodowli tych roślin. Niskie plony nasion hamują wprowadzenie do uprawy pod wieloma względami ważnych odmian tego gatunku.

Niniejsze badania kariologiczne i rozwoju pyłku, mogą więc w pewnym stopniu dać wyjaśnienie niskiej płodności i słabego zawiązywania nasion u odmian tego gatunku w warunkach klimatycznych Europy Środkowej, a szczególnie Polski.

MATERIAŁ I METODY

Materiał *M. sativa* w postaci nasion sprowadzony został w 1968 r. z Zjednoczenia Hodowli Roślin i Nasiennictwa w Warszawie, z Zakładu Biologii i Fizjologii Rozwoju Roślin w Radzikowie, Lubelskiego Przedsiębiorstwa „Centrala Nasienna” Oddział w Zamościu, z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin i Stacji Hodowlano-Badawczej w Bartążku pow. Olsztyn. Sprowadzone nasiona pięciu odmian *M. sativa*, a mianowicie: 'Australijska', 'Grimma', 'Kleszczewska', 'Miechowska' i 'Warmińska' wysiano na polu doświadczalnym Katedry Genetyki WSR w Olsztynie.

Stożki wzrostu korzonków roślin kwitnących, utrwalono w terenie utrwalaczem Nawaszyna rozcieńczonym wodą destylowaną (1 : 1). Bardziej dogodnym materiałem do badań kariologicznych były korzonki wykiełkowanych w pracowni nasion, które utrwalono również w 50% utrwalaczu Nawaszyna.

Badania nad rozwojem pyłku prowadzono na kwiatach w różnych stadiach rozwojowych; poczynając od bardzo młodych pączków, a kończąc na rozkwitniętych.

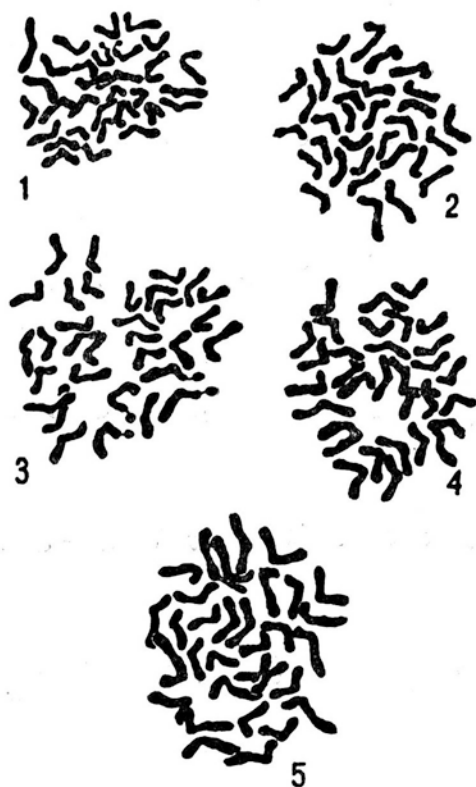
Pączki kwiatowe utrwalono w terenie również w 50% utrwalaczu Nawaszyna. Utrwalony materiał zatopiono w parafinie przy 52°C i krajano na mikrotomie na skrawki o grubości 10 μ m.

Zarówno w badaniach kariologicznych w stożkach wzrostu korzonków, jak i stadiach rozwojowych pyłku preparaty barwiono fioletem gencjanowym różnicując je roztworem fenolu w ksylie (1 : 3).

Rysunki wykonano aparatem Zeissa spod mikroskopu NfpK przy użyciu obiektów 90 \times , 40 \times , w połączeniu z okulem K 20 \times Zeissa. Przy każdym rysunku podano właściwe powiększenie.

LICZBY CHROMOSOMÓW I ICH MORFOLOGIA

Liczby chromosomów zostały ustalone w metafazach somatycznych merystemów stożków wzrostu korzeni oraz w diakinezie, metafazie i anafazie pierwszego i drugiego podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku.



Ryc. 1 - 5. Metafazy somatyczne w merystemach stożków wzrostu korzenia *Medicago sativa* L.

1 — odmiana 'Warmińska', 2 — odmiana 'Australijska', 3 — odmiana 'Miechowska', 4 — odmiana 'Grimma', 5 — odmiana 'Kleszczewska' ($\times 2400$).

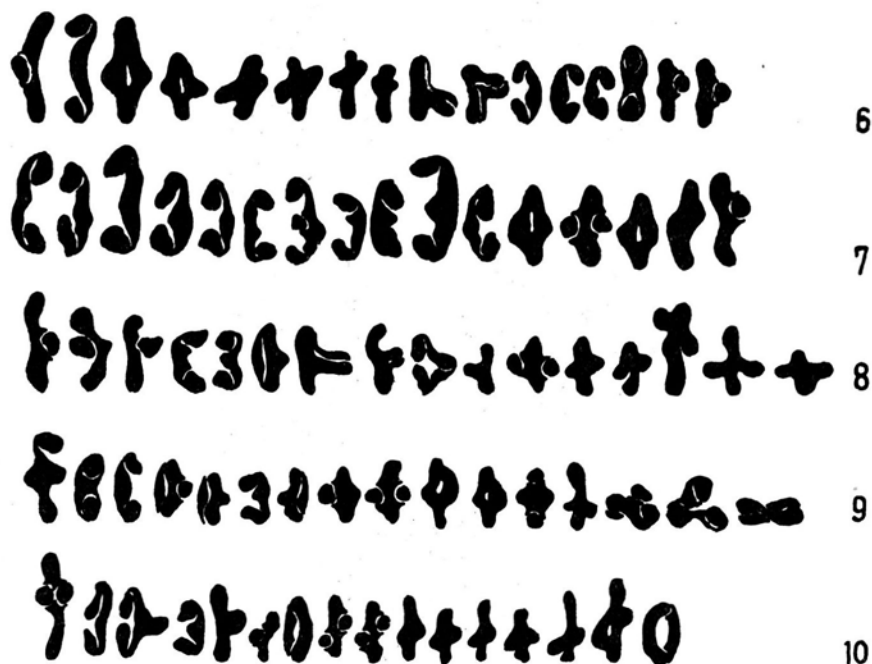
Figs. 1 - 5. Somatic metaphases in root-tip of *Medicago sativa* L.

1 — cv. Warmińska, 2 — cv. Australijska, 3 — cv. Miechowska, 4 — cv. Grimma, 5 — cv. Kleszczewska, ($\times 2400$).

W toku badań została potwierdzona uprzednio ustalona przez szereg autorów dla wszystkich odmian tego gatunku liczba $n = 16$, $2n = 32$ chromosomów (rys. 1 - 10, 18, 20, 23, 31, 33, 36, 44, 46, 49, 57, 59, 62, 70, 72, 75). Zatem wszystkie badane odmiany posiadają charakterystyczną dla tego rodzaju podstawową liczbę $x = 8$ chromosomów.

Poszczególne chromosomy z płytek somatycznych można zestawić

u wszystkich badanych odmian w 16 par odpowiadających sobie długością i kształtem (rys. 1-5). Pary te różnią się od siebie dość znacznie pod względem morfologii i długości. U odmiany 'Australijskiej', 'Grimma' i 'Kleszczewskiej' chromosomy można podzielić na dwie grupy (rys. 2, 4, 5); chromosomy równoramienne o stosunku ramion 1:1, chro-



Rys. 6-10. Bivalenty z metafazy pierwszego podziału mejotycznego komórek macierzystych pyłku *Medicago sativa* L.

6 — odmiana 'Warmińska', 7 — odmiana 'Australijska', 8 — odmiana 'Miechowska', 9 — odmiana 'Grimma', 10 — odmiana 'Kleszczewska' ($\times 2400$).

Figs. 6-10. Bivalents from first metaphase in P.M.C's of *Medicago sativa* L.

6 — cv. Warmińska, 7 — cv. Australijska, 8 — cv. Miechowska, 9 — cv. Grimma, 10 — cv. Kleszczewska ($\times 2400$).

mosomy dwuramienne o stosunku ramion mniej więcej 1:3. U odmian 'Miechowskiej' i 'Warmińskiej' na trzy grupy: chromosomy równoramienne o stosunku ramion 1:1, chromosomy dwuramienne o stosunku ramion mniej więcej 1:3 bez trabanta i chromosomy dwuramienne o stosunku ramion mniej więcej 1:3 z trabantem na krótszym ramieniu (rys. 1, 3). Ilościowe stosunki tych chromosomów oraz długości chromosomów u badanych odmian są przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1 — Table 1

Porównanie długości i proporcji ramion chromosomów u 5 odmian
Medicago sativa L.

Comparison of the length and proportion of chromosome arms of five
Medicago sativa L. varieties

| Gatunek Species Odmiana Variety | Proporcje ramion Proportions of arms | Liczba par bez trabanta Number of pairs without trabant | Liczba par bez trabanta Number of pairs without trabant | Liczba par z trabantem Number of pairs with trabant | Przybliżona długość w mikronach Approximate length in microns |
|---|---|---|---|---|--|
| <i>Medicago sativa</i> cvar. 'Australijska' (2n = 32) | 1 : 1 | 1 | | | 3,3 |
| | | 1 2 | | | 2,9 2,5 |
| | 1 : 3 | | 1 | | 3,6 |
| | | | 1 | | 3,0 |
| | | | 2 | | 2,9 |
| | | | 3 5 | | 2,5 2,0 |
| <i>Medicago sativa</i> cvar. 'Grimma' (2n = 32) | 1 : 1 | 3 | | | 4,1 |
| | | 4 | | | 3,3 |
| | | 1 | | | 2,9 |
| | | 3 1 | | | 2,5 2,0 |
| <i>Medicago sativa</i> cvar. 'Kleszczewska' (2n = 32) | 1 : 3 | | 1 | | 2,7 |
| | | | 3 | | 2,5 |
| | 1 : 1 | 2 | | | 4,1 |
| | | 2 | | | 3,3 |
| | | 2 | | | 2,5 |
| | | | 1 1 3 2 1 1 1 | | 4,1 3,9 3,7 3,1 2,9 2,5 2,0 |
| <i>Medicago sativa</i> cvar. 'Miechowska' (2n = 32) | 1 : 1 | 1 | | | 3,3 |
| | | 6 | | | 2,5 |
| | 1 : 3 | | 1 1 5 | | 3,3 2,7 2,5 |
| | | | | 1 1 | 4,5 3,7 |
| <i>Medicago sativa</i> cvar. 'Warminska' (2n = 32) | 1 : 1 | 1 | | | 3,3 |
| | | 2 | | | 2,9 |
| | | 3 | | | 2,5 |
| | | 3 | | | 2,0 |
| | 1 : 3 | | 1 2 1 1 | | 2,9 2,5 2,2 2,0 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | 1 : 3 | | | | 3,1 |

OBSERWACJE NAD ROZWOJEM PYLNIKA I ZIARN PYŁKU

1. Topografia pylnika

W młodym pylniku u badanych odmian *M. sativa* na przekroju poprzecznym widoczne były cztery komory ze zgrupowanymi w nich w centralnej części komórkami macierzystymi pyłku. Komórki macierzyste pyłku przylegają ściśle do siebie i wyraźnie różnią się od otaczających je komórek warstwy tapetum (rys. 11 a, b). Liczba komórek macierzystych na przekroju poprzecznym pylnika waha się w granicach od 8 do 10. Ściany pylnika w tym stadium rozwoju zbudowane są ze skórki, warstwy włóknistej, warstwy zanikającej i warstwy komórek tapetum.

2. Tapetum

W stadiach premejotycznych warstwa komórek tapetum u wszystkich odmian *M. sativa* zbudowana była z komórek jednojądrowych, o kształcie prawie kwadratowym, wypełnionych ziarnistą cytoplazmą (rys. 11 b).

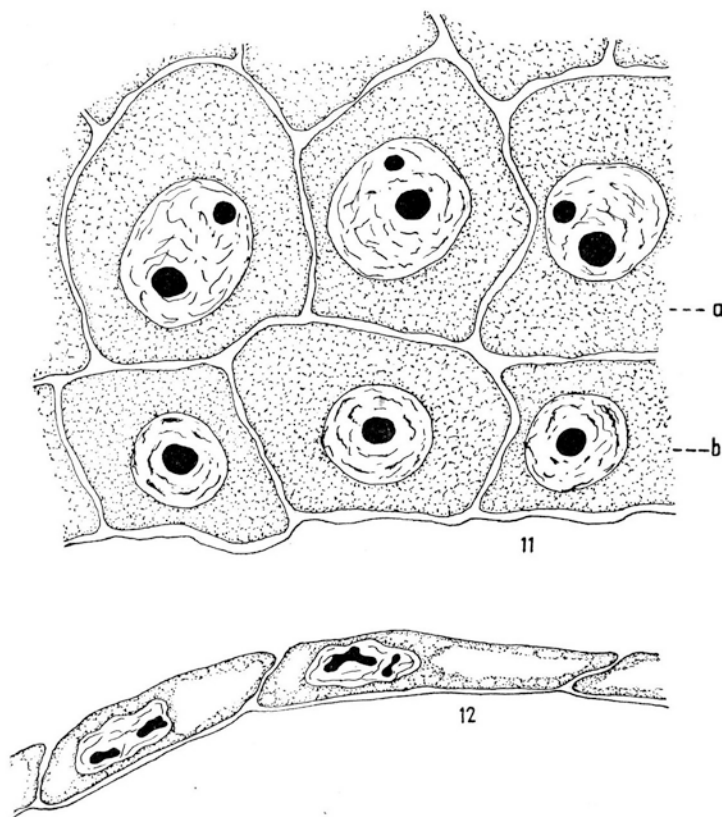
Nie obserwowano w żadnym przypadku podziału jąder w komórkach tapetum, jak też zlewania się ich lub zwiększania liczby chromosomów w drodze endomitozy. Można stąd wnioskować, że jądra komórek tapetum były diploidalne. W miarę wzrostu pylnika na długość, komórki tapetum wydłużały się i przybierały kształt wrzecionowaty. W ich cytoplazmie w tym czasie pojawiały się początkowo małe wodniczki, które w starszych komórkach łączyły się i tworzyły wodniczkę centralną.

W czasie dojrzewania ziarn pyłku komórki tapetum ulegały postępującej degeneracji (rys. 12). Ujawniało się to utratą barwliwości jądra, zanikiem błon komórkowych, a w końcu degeneracją całych komórek.

3. Mikrosporogeneza

W komórkach pylnikowych badanych odmian *M. sativa* komórki macierzyste pyłku różniły się bardzo wyraźnie od komórek warstwy tapetum (rys. 11 a,b). Przylegały one ściśle do siebie, a wskutek wzrostu pylnika na długość zaokrąślały się i traciły swoją spoistość, przez co tworzyły się pomiędzy nimi przestwory międzykomórkowe. W stadium diakinezy widoczne były jako pojedyncze komórki luźno ułożone w komorach pylnikowych.

Nie wszystkie komórki macierzyste pyłku u badanych odmian dochodziły do tego stadium rozwoju. Obserwowano u wszystkich odmian



Rys. 11 - 12. *Medicago sativa* — odmiana 'Miechowska'

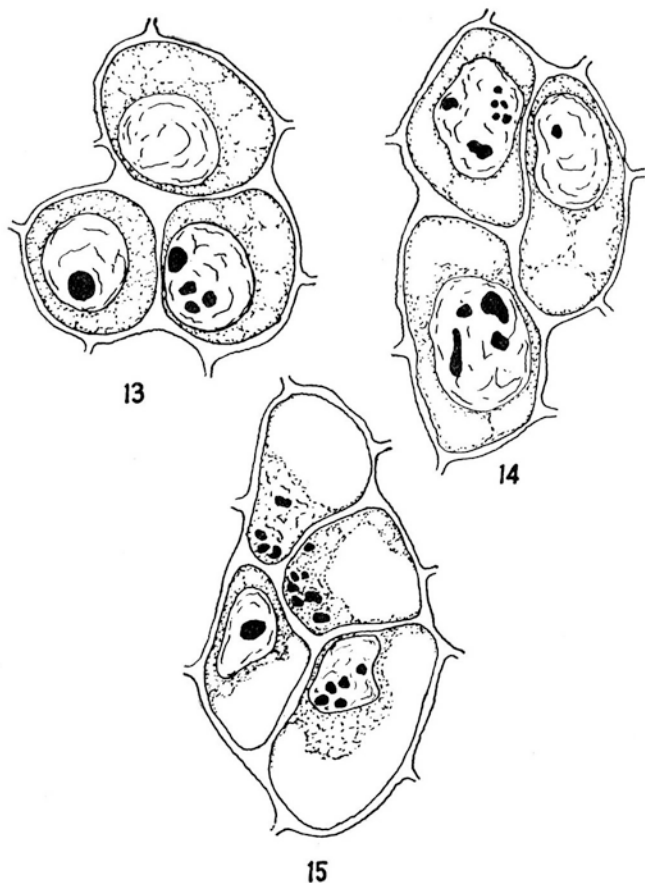
11a — komórki macierzyste pyłku, 11b — komórki warstwy tapetum ($\times 1200$), 12 — Degenerujące komórki tapetum ($\times 1200$).

Figs. 11 - 12. *Medicago sativa* — cv. 'Miechowska'

a — P.M.C's, b — tapetal cells ($\times 800$). 12 — Degenerated tapetal cells ($\times 1200$)

w niektórych komorach pylnikowych stopniowe degenerowanie komórek macierzystych pyłku (rys. 13 - 15). Zjawisko to występowało z różnym natężeniem u badanych odmian. Najczęściej proces ten obserwowany był u odmiany 'Miechowskiej' w ilości około 40%, natomiast u odmiany 'Warminskiej' około 20%, u odmiany 'Grimma' około 30%, u odmiany 'Kleszczewskiej' około 23%, a najniższy u odmiany 'Australijskiej' w ilości około 17%.

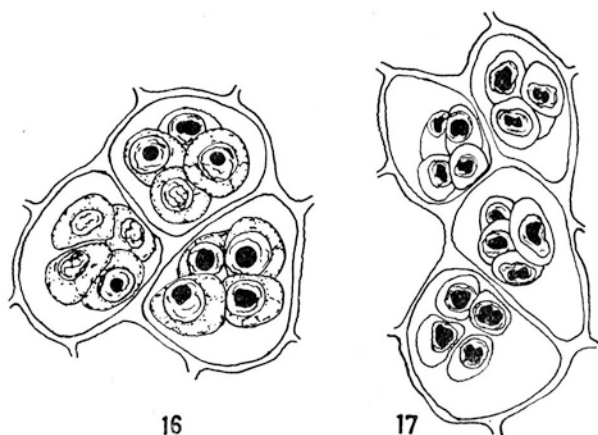
W degenerujących komórkach macierzystych pyłku nie obserwowano w żadnym przypadku podziałów mejotycznych. W komórkach pylnikowych obserwowano u badanych odmian procentowo mniejszą liczbę komórek macierzystych pyłku, w których podziały mejotyczne zachodziły.



15

Rys. 13 - 15. *Medicago sativa* — odmiana 'Warمیńska'. Stadia obumierania komórek macierzystych pyłku ($\times 800$).

Figs. 13 - 15. *Medicago sativa* — cv. Warمیńska. Stages of dying pollen mother cells ($\times 800$).

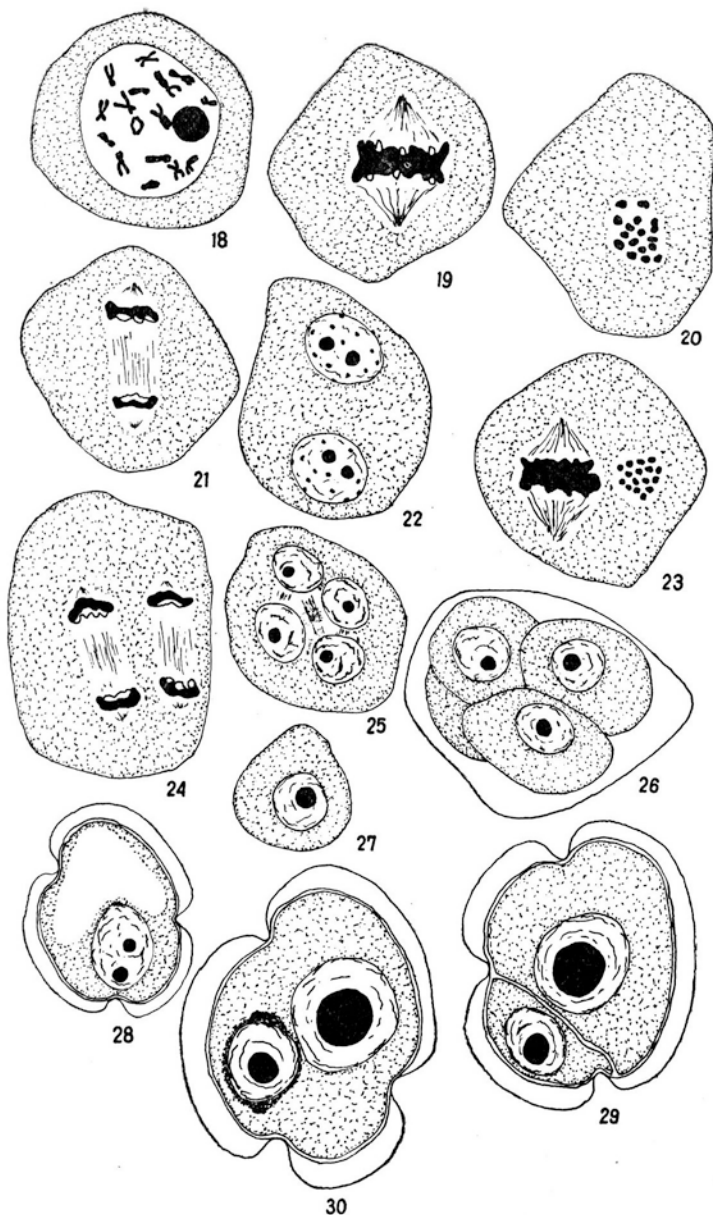


16

17

Rys. 16 - 17. *Medicago sativa* — odmiana 'Warمیńska'. Stadia obumierania tetrad mikrospor ($\times 800$).

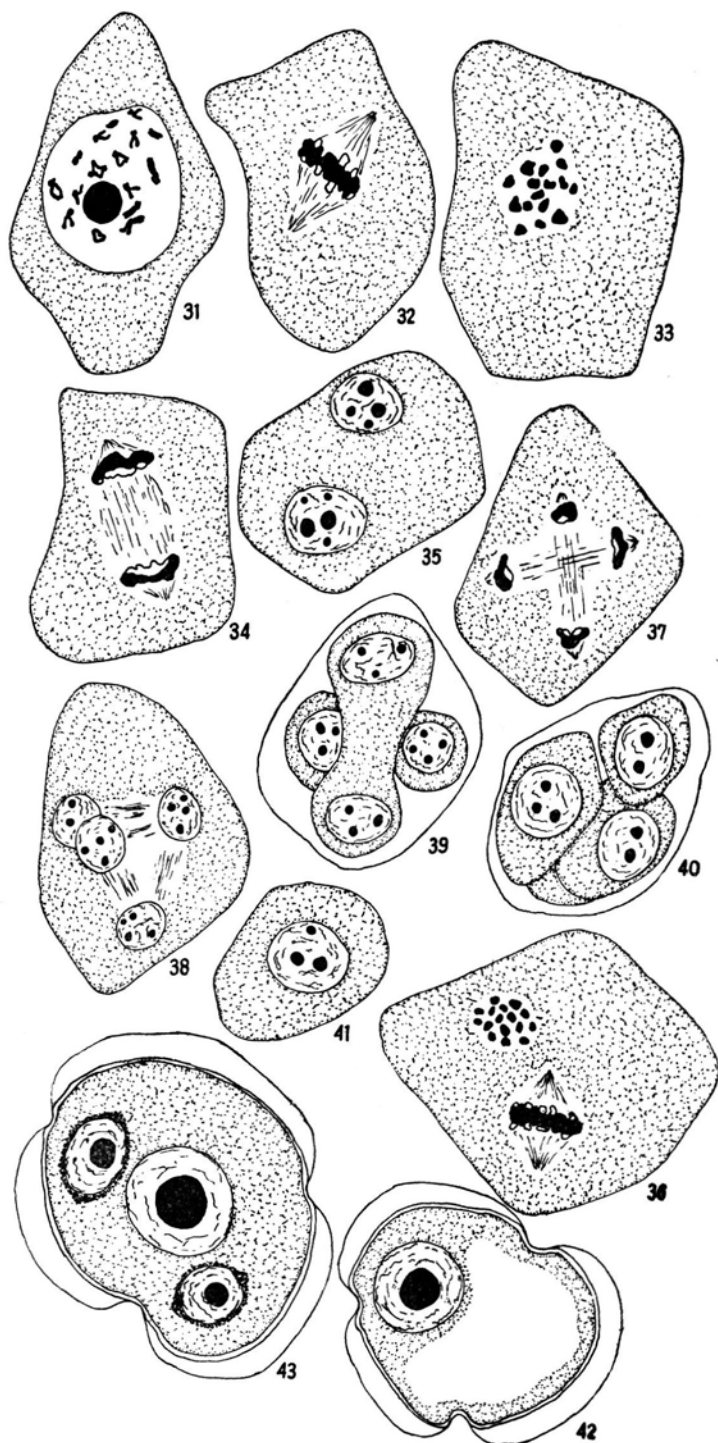
Figs. 16 - 17. *Medicago sativa* — cv. Warمیńska. Mortifying stages of microspore tetrads ($\times 800$).



30

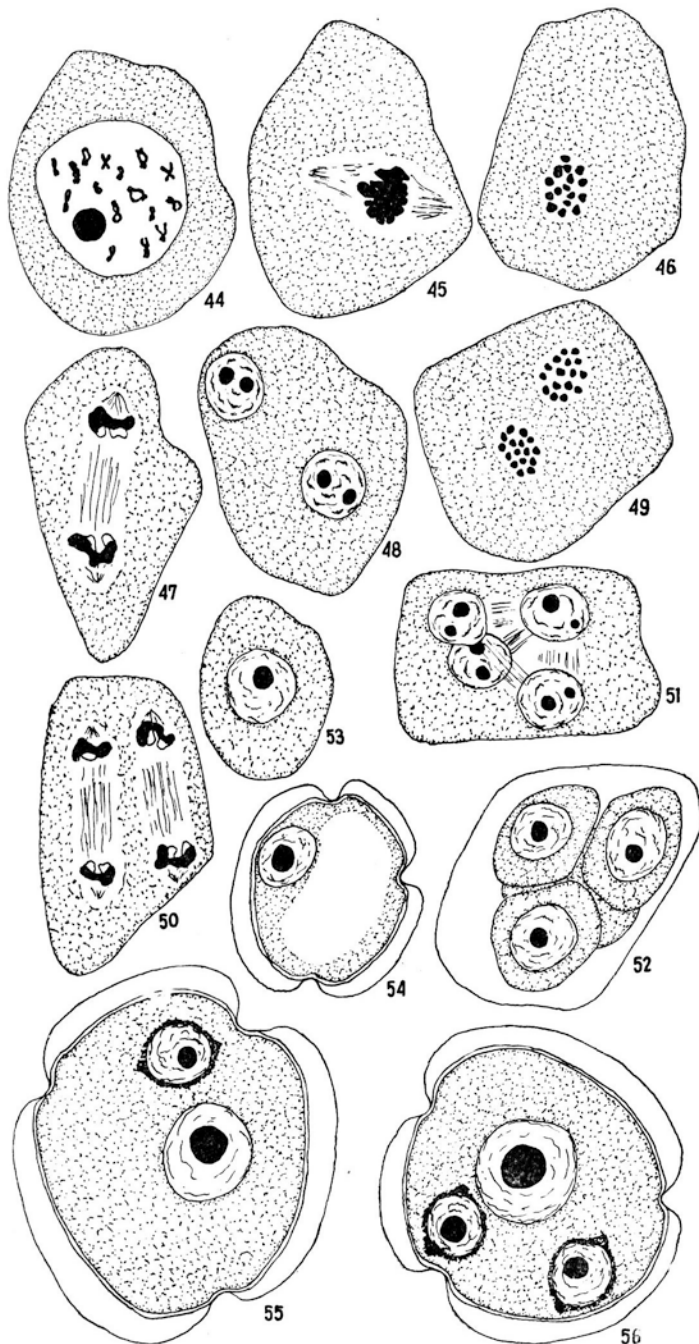
Rys. 18 - 30. *Medicago sativa* L. — odmiana 'Australijska'. Rozwój pyłku
 18 — diakineza, 19 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 20 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 21, 22 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 23 - 25 — meta-, ana- i telofaza drugiego podziału meiotycznego, 26 — tetrada mikrospor. 27, 28 — pierwotne ziarna pyłku, 29 — ziarno pyłku z komórką wegetatywną i komórką generatywną, 30 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i jądrem generatywnym (× 1200).

Figs. 18 - 30. *Medicago sativa* L. — cv. Australijska. Pollen development
 18 — diakinesis, 19 — first metaphase in P.M.C.'s, 20 — first metaphase in P.M.C.'s. — polar view, 21, 22 — first anaphase and telophase in P.M.C.'s, 23 - 25 — second metaphase, anaphase and telophase in P.M.C.'s, 26 — microspore tetrads, 27, 28 — original pollen grain, 29 — pollen grain with vegetative and generative cell, 30 — pollen grain with vegetative and generative nuclei (× 1200).



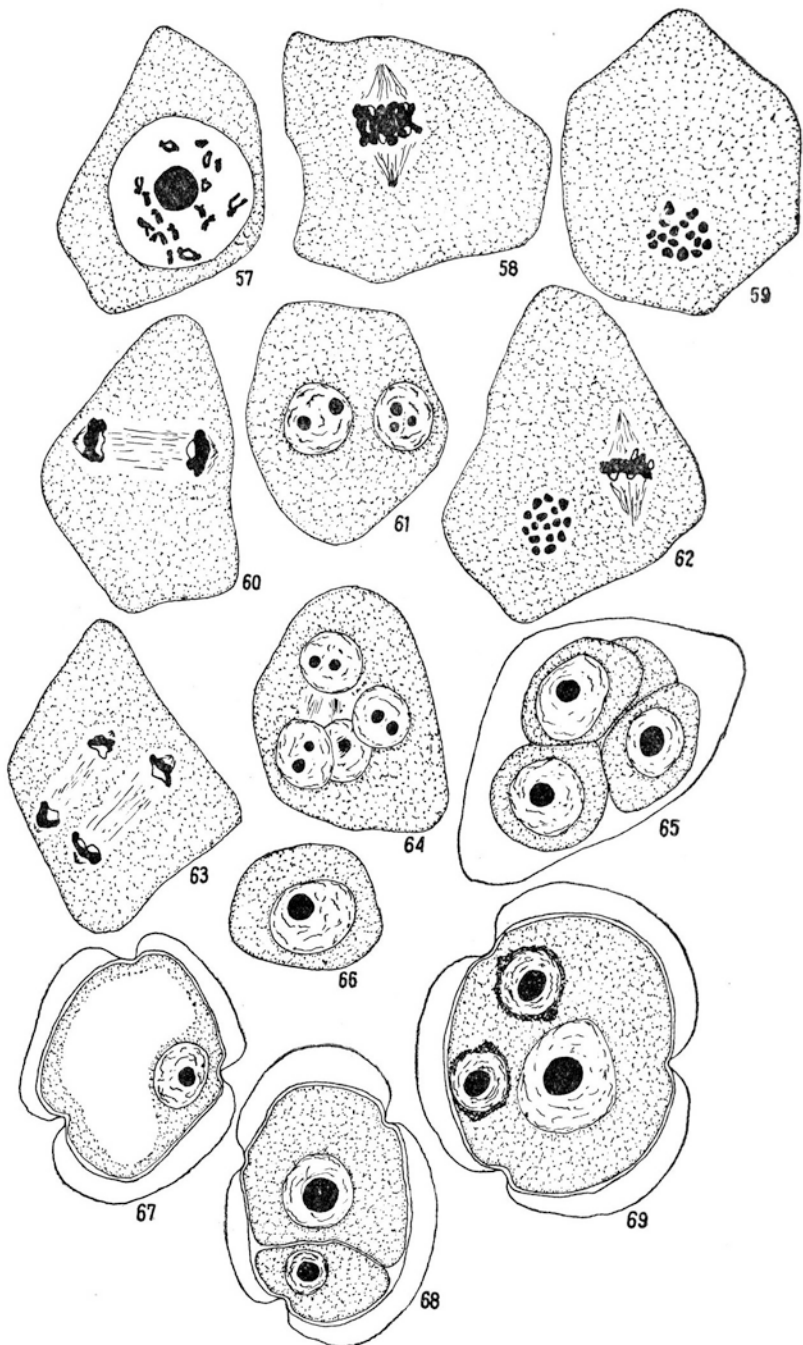
Rys. 31 - 43. *Medicago sativa* L. — odmiana 'Grimma'. Rozwój pyłku
 31 — diakineza, 32 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 33 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 34, 35 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 39, 40 — rozwój tetrady mikrospor, 41, 42 — pierwotne ziarno pyłku, 43 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi (× 1200).

Figs. 31 - 43. *Medicago sativa* L. — cv. Grimma. Pollen development
 31 — diakinesis, 32 — first metaphase in P.M.C's., 33 — first metaphase in P.M.C's., — polar view, 34, 35 — first anaphase and telophase in P.M.C's., 36 - 38 — second meta-, ana- and telophase in P.M.C's., 39, 40 — formation of microspore tetrads, 41, 42 — original pollen grain, 43 — pollen grain with vegetative nucleus and two sperm nuclei (× 1200).



Rys. 44 - 56. *Medicago sativa* L. — odmiana 'Kleszczewska'. Rozwój pyłku
 44 — diakineza, 45 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 46 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 47, 48 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 49 — metafaza drugiego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 50, 51 — anafaza i telofaza drugiego podziału meiotycznego, 52 — tetrad mikrospor, 53, 54 — pierwotne ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym, 55 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1200$).

Figs. 44 - 56. *Medicago sativa* L. — cv. Kleszczewska. Pollen development
 44 — diakinesis, 45 — first metaphase in P.M.C's., 46 — first metaphase in P.M.C's., — polar view, 47, 48 — first anaphase and telophase in P.M.C's., 49 — second metaphase in P.M.C's., — polar view, 50, 51 — second anaphase and telophase in P.M.C's., 52 — microspore tetrads, 53, 54 — original pollen grain with vegetative and generative nuclei, 55 — pollen grain with vegetative and generative nuclei, 56 — pollen grain with vegetative nucleus and two sperm nuclei ($\times 1200$).



Rys. 57—69

Dokładne badanie mejozy prowadzone było od stadium diakinezy. W tym stadium u wszystkich odmian wyróżniono 16 par chromosomów (rys. 18, 31, 44, 57, 70). Obserwowano tutaj u każdej odmiany charakterystyczne konfiguracje (rys. 18, 31, 44, 57, 70).

W metafazie pierwszego podziału mejotycznego, podobnie jak i w diakinezie, chromosomy koniugują z sobą w postaci biwalentów (rys. 6 - 10, 19, 20, 32, 33, 45, 46, 58, 59, 71, 72). Biwalenty poszczególnych odmian różnią się dość wyraźnie pomiędzy sobą (rys. 6 - 10). Płytki chromosomowe w tym stadium leżały w środku, albo były nieco zepchnięte ku obwodowi komórki macierzystej pyłku i tworzyły jedno dość silnie zbite skupienie (rys. 19, 32, 45, 58, 71). W tym stadium występowało wyraźnie wykształcone dwubiegunowe wrzeciono kariokinetyczne (rys. 19, 32, 45, 58, 71).

Stadium anafazy pierwszego podziału mejotycznego, podobnie jak stadium metafazy pierwszego podziału, miało przebieg normalny (rys. 21, 34, 47, 60, 73). Rozchodzenie się chromosomów na bieguny było zawsze wyraźnie zsynchronizowane. Pomiedzy rozchodzącymi się na bieguny grupami chromosomów w liczbie haploidalnej występował dość wyraźnie wykształcony fragmoplast (rys. 21, 34, 47, 60, 73), który utrzymywał się do końca pierwszego podziału mejotycznego, po czym zanikał (rys. 22, 35, 38, 61, 74).

W stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego obie płytki chromosomowe i oba wrzeciona układają się równolegle, częściej jednak prostopadle do siebie (rys. 23, 36, 49, 62, 75).

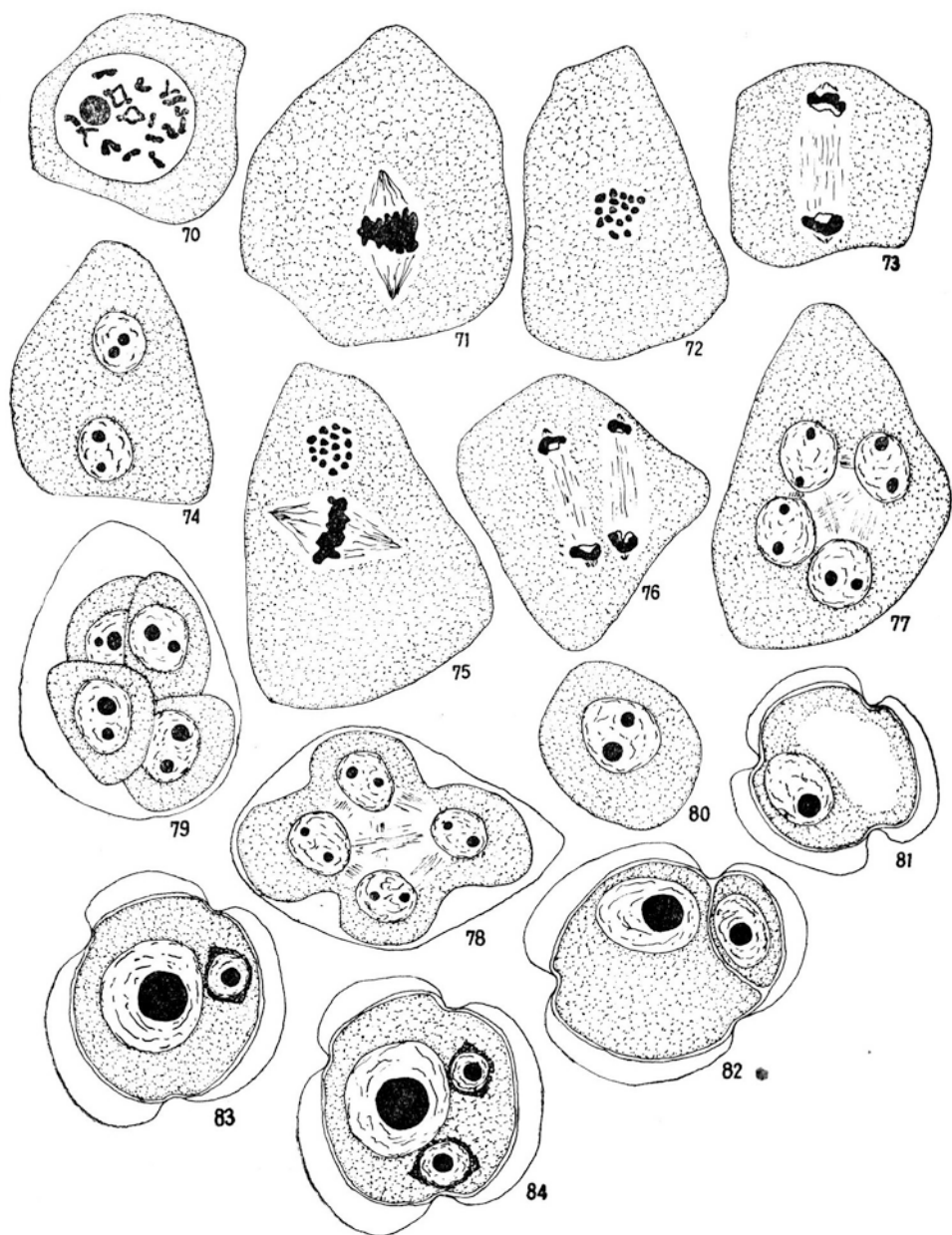
W stadium anafazy drugiego podziału mejotycznego, podobnie jak w stadium anafazy pierwszego podziału mejotycznego, występowało zsynchronizowane rozchodzenie się chromosomów na bieguny (rys. 24, 37, 50, 63, 76). Podobnie i tutaj, pomiędzy rozchodzącymi się na bieguny

Rys. 57 - 69. *Medicago sativa* L. — odmiana 'Miechowska'. Rozwój pyłku

57 — diakineza, 58 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego, 59 — metafaza pierwszego podziału mejotycznego — widoczna z góry, 60, 61 — anafaza i telofaza pierwszego podziału mejotycznego, 62 - 64 — metafaza, anafaza i telofaza drugiego podziału mejotycznego, 65 — tetrada mikrospor, 66, 67 — pierwotne ziarno pyłku, 68 — ziarno pyłku z komórką vegetatywną i generatywną, 69 — ziarno pyłku z jądrem vegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1200$).

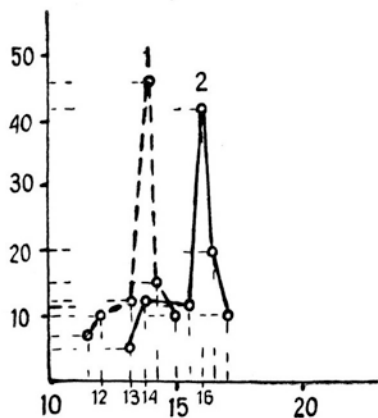
Figs. 57 - 69. *Medicago sativa* L. — cv. Miechowska. Pollen development

57 — diakinesis, 58 — first metaphase in P.M.C's., 59 — first metaphase in P.M.C's., — polar view, 60, 61 — first anaphase and telophase in P.M.C's., 62 - 64 — second metaphase, anaphase and telophase in P.M.C's., 65 — microspore tetrads, 66, 67 — original pollen grain, 68 — pollen grain with vegetative and generative cell, 69 — pollen grain with vegetative nucleus and two sperm nuclei ($\times 1200$).

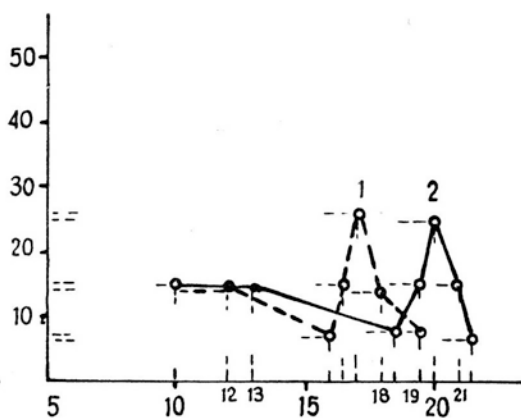


Rys. 70 - 84. *Medicago sativa* L. — odmiana 'Warمیńska'. Rozwój pyłku
 70 — diakneza, 71 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego, 72 — metafaza pierwszego podziału meiotycznego — widoczna z góry, 73, 74 — anafaza i telofaza pierwszego podziału meiotycznego, 75 - 77 — metafaza, anafaza i telofaza drugiego podziału meiotycznego, 78, 79 — rozwój tetrady mikrospora, 80, 81 — pierwotne ziarno pyłku, 82 — ziarno pyłku z komórką wegetatywną i generatywną, 83 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i generatywnym, 84 — ziarno pyłku z jądrem wegetatywnym i dwoma jądrami plemnikowymi ($\times 1200$).

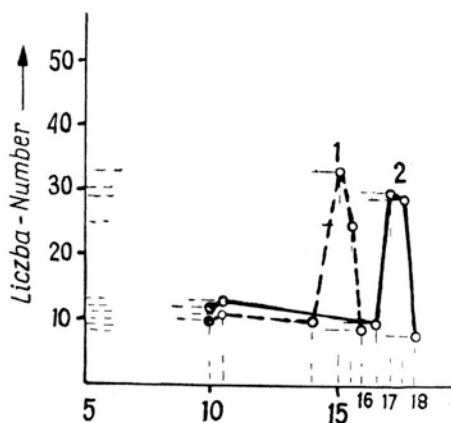
Figs. 70 - 84. *Medicago sativa* L. — cv. Warمیńska. Pollen development
 70 — diakinesis, 71 — first metaphase in P.M.C's., 72 — first metaphase in P.M.C's., — polar view, 73, 74 — first anaphase in P.M.C's., 75 - 77 — second meta-, ana- and telophase in P.M.C's., 78 - 79 — formation of microspore tetrads, 80, 81 — original pollen grain, 82 — pollen grain with vegetative and generative cell, 83 — pollen grain with vegetative and generative nuclei, 84 — pollen grain with vegetative and two sperm nuclei ($\times 1200$).



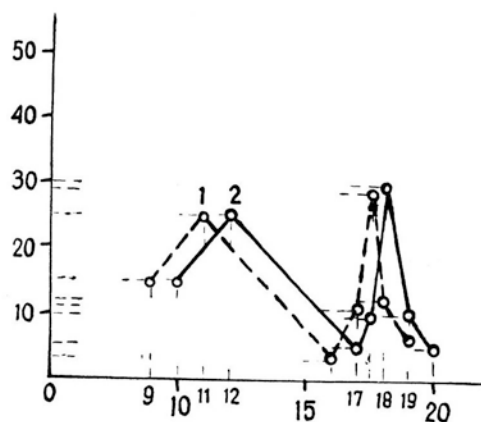
85



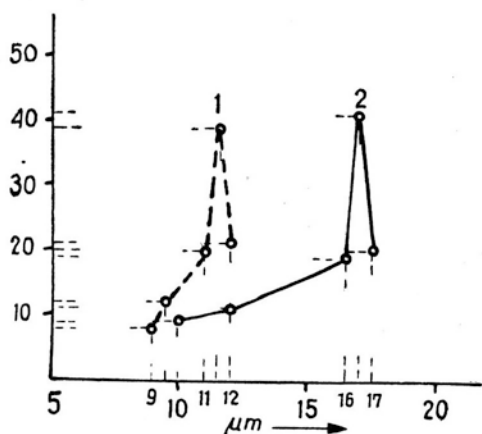
86



87



88



89

Rys. 85 - 89. *Medicago sativa* L. — Wykresy szerokości i długości ziarn pyłku w mikronach.

1 — szerokość, 2 — długość.

Figs. 85 - 89. *Medicago sativa* L. — Graphs of the width and length of pollen grain in microns.

1 — width, 2 — length, 85 — odmiana (cv.) 'Australijska'; 86 — odmiana (cv.) 'Grimma'; 87 — odmiana (cv.) 'Kleszczewska'; 88 — odmiana (cv.) 'Miechowska'; 89 — odmiana (cv.) 'Warmińska'.

chromosomami, występował dość wyraźnie wykształcony fragmoplast (rys. 24, 37, 50, 63, 76).

W stadium telofazy drugiego podziału meiotycznego komórki macierzyste pyłku posiadały po cztery jądra, z których trzy widoczne były mniej więcej w jednej płaszczyźnie, czwarte zaś leżało nieco głębiej (rys. 25, 38, 51, 64, 77). Pomiedzy jądrami występowało sześć wyraźnych fragmoplastów (rys. 25, 38, 51, 64, 77, 78). Początkowo w cytoplazmie komórki macierzystej pyłku zarysowywało się sześć bruzd, które przez pogłębienie się rozdzielały protoplast komórki macierzystej pyłku na cztery grupy (rys. 34, 78). Protoplasty te początkowo powiązane były mostkami cytoplazmatycznymi, w dalszym rozwoju ulegały nierównoczesnemu rozerwaniu. Każdy z tych protoplastów posiadał silnie barwiące się jądro. Zgodnie z tym powstawała w każdej komórce macierzystej pyłku tetrada mikrospor (rys. 26, 40, 52, 65, 79). Występuje tutaj u wszystkich badanych odmian *M. sativa* podział równoczesny, uważany za charakterystyczny dla *Dicotyledones*. Powstałe w ten sposób cztery komórki, zostały w dalszym rozwoju uwolnione z błony komórki macierzystej pyłku (rys. 27, 49, 53, 66, 80).

U badanych odmian proces ten ulegał w ostatnim stadium również dość silnym zaburzeniom. Mianowicie tetrady mikrospor znajdujące się jeszcze w obrębie błony komórki macierzystej pyłku często obumierały i ulegały degeneracji. Procentowo objawiało się to u poszczególnych odmian podobnie jak u badanych odmian w komórkach macierzystych pyłku. Obserwowano degenerację i obumieranie całych tetrad (rys. 16, 17).

4. Dalszy rozwój pierwotnych ziarn pyłku

Pierwotne ziarna pyłku bezpośrednio po uwolnieniu się z błony komórki macierzystej pyłku otoczone były pojedynczą błoną — intyną (rys. 27, 49, 53, 66, 80). Egzyna początkowo przedstawiała się jako cienka warstwa, z czasem narastała, grubiała i wtedy dość łatwo było w niej obserwować trzy wgłębienia sięgające do samej intyny — porusy (rys. 28 - 30, 42, 54 - 56, 67 - 69, 81 - 84).

Początkowo wewnątrz pierwotnych ziarn pyłku występowała duża centralnie umieszczona wodniczka oraz zepchnięte przez nią na ścianę duże jądro z jednym lub dwoma jąderkami (rys. 28, 42, 54, 67, 81).

Po podziale mitotycznym, w ziarnie pyłku badanych odmian widoczne były dwa jądra, a mianowicie: większe wegetatywne i mniejsze generatywne oddzielone błoną (rys. 29, 68, 82). Jądro komórki wegetatywnej charakteryzowało się kulistym kształtem, słabszą barwliwością i luźną strukturą (rys. 29, 68, 82). Jądro komórki generatywnej natomiast było również kuliste, odznaczało się jednak silną barwliwością i zbitą

strukturą (rys. 29, 68, 82). Z obserwacji wynikało, że komórka generatywna jest mniejsza od wegetatywnej (rys. 29, 68, 82). Błona oddzielająca w ziarnie pyłku jądro wegetatywne od jądra generatywnego po pewnym czasie zanika, a oba jądra, zarówno wegetatywne, jak i generatywne znajdowały się obok siebie w cytoplazmie komórki wegetatywnej (rys. 30, 55, 83). Należy zaznaczyć, że jądro generatywne było otoczone cienką warstwą własnej cytoplazmy (rys. 30, 55, 83).

W dalszym stadium rozwoju ziarn pyłku, po podziale mitotycznym jądra generatywnego, ziarna pyłku znajdowały się w stadium trójjądrowym, posiadały bowiem jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe (rys. 43, 56, 69, 84). W tym czasie zachodziło pęknięcie pylników i wysypywanie się pyłku.

W wielkości ziarn pyłku badanych form występowały nieznaczne różnice. Długość ziarn pyłków u odmiany 'Australijskiej' mieści się w granicach od około 15,5 μm do około 17,0 μm , odmiany 'Grimma' od około 18,5 μm do około 21,5 μm , odmiany 'Kleszczewskiej' od około 16,5 μm do około 18,0 μm , odmiany 'Miechowskiej' od około 17,0 μm do około 20 μm i odmiany 'Warmińskiej' od około 16,5 μm do około 17,5 μm . Szerokość natomiast ziarn pyłku u badanych odmian mieści się w następujących granicach: 'Australijskiej' od około 13,0 μm do około 15,0 μm , 'Grimma' od około 16,0 μm do około 19,5 μm , 'Kleszczewskiej' od około 14,0 μm do około 16,0 μm , 'Miechowskiej' od około 16,0 μm do około 19,0 μm i 'Warmińskiej' od około 11,0 μm do około 12,0 μm (rys. 85 - 89).

Należy zaznaczyć, że w czasie rozwoju pyłku badanych odmian zachodziły również pewne zaburzenia. Mianowicie, w tej samej procentowo liczbie u pierwotnych ziarn pyłku co poprzednio, przy obumieraniu komórek macierzystych pyłku i tetrad mikrospor, występowało wstrzymanie ich dalszego rozwoju. U tych pierwotnych ziarn pyłku wykształcała się, podobnie jak u normalnych ziarn pyłku, druga błona — egzyrna, jądra ich jednak nie dzieliły się. Również ich wzrost ulegał w pewnym stopniu zahamowaniu. Ich długość mieściła się w granicach u odmiany 'Australijskiej' od około 13,0 μm do około 13,5 μm , u odmiany 'Grimma' w granicach od około 10,0 μm do około 13,0 μm , u 'Kleszczewskiej' od około 10,0 μm do około 10,5 μm , u 'Miechowskiej' od około 10,0 μm do około 12,0 μm , a u odmiany 'Warmińskiej' w granicach od około 10,0 μm do 12,0 μm . Szerokość zaś mieściła się u odmiany 'Australijskiej' w granicach od około 11,5 μm do około 12,0 μm , u odmiany 'Grimma' od około 10,0 μm do około 12,0 μm , u 'Kleszczewskiej' od około 10,0 μm do około 10,5 μm , u 'Miechowskiej' od około 9,0 μm do około 11,0 μm i u odmiany 'Warmińskiej' od około 9,0 μm do około 9,5 μm .

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak podano na wstępie pracy, celem jej było zbadanie kariologii i rozwoju pyłku pięciu odmian *M. sativa*. Badania te miały stanowić przyczynek do ustalenia, czy w procesie kształtowania się pyłku tych odmian istnieje przyczyna wywołująca słabe zawiązywanie nasion u tych odmian.

Wyniki badań kariologicznych u badanych odmian *M. sativa* dowodzą, że gatunek ten posiada liczbę $n = 16$, $2n = 32$ chromosomów (rys. 1 - 10). Liczby te są zgodne z podanymi przez szereg autorów zajmujących się kariologią tego gatunku.

W czasie podziału mejotycznego w komórkach macierzystych pyłku, a mianowicie w stadium diakinezy i metafazy pierwszego podziału, chromosomy występowały wyłącznie w postaci biwalentów (rys. 6 - 10); należy zaznaczyć, że w żadnym przypadku nie obserwowano występowania uni-, tri-, względnie tetrawalentów, jak to obserwowali u *M. sativa* Reeves (1930), Cooper (1935), Julen (1944), Grun (1951 a) i Kazimierski (1970). Nie obserwowano również zaburzeń w czasie rozchodzenia się chromosomów na bieguny w stadium anafazy pierwszego i drugiego podziału mejotycznego. Rozchodzenie się chromosomów na bieguny u wszystkich badanych odmian było wyraźnie zsynchronizowane (rys. 21, 24, 34, 37, 47, 50, 60, 63, 73, 76). Z tych komórek macierzystych pyłku rozwijał się pyłek normalny, który w stadium dojrzałości zawierał jedno jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe (rys. 43, 56, 69, 84). Zaburzenia w rozchodzeniu się chromosomów w stadium anafazy pierwszego i drugiego podziału mejotycznego u *M. sativa* obserwowali Reeves (1930), Cooper (1935, 1939), Julen (1944), Grun (1951 a) Nicoloff (1963), a Kazmierski (1970) u *M. falcata* i *M. media*.

Powodem tych zaburzeń było według tych autorów u roślin *M. sativa* występowanie uni-, tri- i tetrawalentów w koniugacji chromosomów w stadium pierwszego podziału mejotycznego. W wyniku tych zaburzeń autorzy ci obserwowali komórki macierzyste z wieloma mikrosporami, jak również występowanie tzw. mikrojąder. Prowadziło to do wykształcenia się pyłku martwego, którego ilość wg Gruna (1951 a) waha się u *M. sativa* od 6,36 do 40,5%.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono u roślin badanych odmian *M. sativa* obumieranie komórek macierzystych pyłku (rys. 13 - 15), tetrad mikrospor (rys. 16, 17) i mikrospor. Ilościowo liczba obumierających komórek w każdym przypadku wynosiła u odmiany 'Australijskiej' około 17%, u odmiany 'Grimma' około 30%, u odmiany 'Kleszczewskiej' około 23%, u odmiany 'Miechowskiej' około 35% i u odmiany 'Warmińskiej' około 20%. Było to powodem występowania w niektórych

komorach pylnikowych znikomej ilości wykształconych normalnie pyłków wraz z obumarłymi komórkami macierzystymi pyłku ze zdegenerowanymi tetradami mikrospor. Poza tym występował w nich pyłek nienormalnie wykształcony, posiadający błony intynę i egzynę, a zawierający tylko jedno jądro komórkowe o kształcie nieregularnym, słabo barwiące się, wykazujące cechy obumierania. Cebra t (1967, 1969) oraz R a u s c h (1964) obserwowali u *M. media* Pers. wykształcanie się ziarn pyłku ha-, di- i tetraploidalnych. Powstawały one w wyniku zahamowania cytokinezy występującej normalnie po drugim podziale mejotycznym. Cebra t (1969) przypuszcza, że określony charakter zaburzeń, występujący u roślin spokrewnionych może być spowodowany defektem genetycznym. Może to oznaczać, że wada genetycznego układu u tych roślin jest takiego typu, że będą one zdolne do wytwarzania normalnych ziarn pyłku w pewnych zewnętrznych warunkach środowiska, podczas gdy w innych tylko tetraploidalne ziarna. Należałoby dodać, że u niektórych roślin wykształcających haploidalne pyłki, odpowiednio dobrane czynniki zewnętrznego środowiska mogą indukować zaburzenia w cytokinezie. Zaburzenia te prowadzą do poliploidyzacji pewnych ziarn pyłku (S a x 1937; G i l e s 1939).

Przeprowadzone badania u odmian *M. sativa* do czasu wykształcania się dojrzałego pyłku nie wskazują na to, aby w rozwoju pyłku mogły tkwić przyczyny wpływające na obniżoną ich płodność. Przyczyny te mogą tkwić w procesie rozwoju woreczka zalążkowego, procesie zapłodnienia, rozwoju zarodka i bielma lub braku odpowiedniej ilości pyłku przy niedostatecznej liczbie zapylaczy w pewnych określonych warunkach środowiska. Zagadnienia te są przedmiotem dalszych badań.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

W toku badań potwierdzono liczby $n = 16$, $2n = 32$ u pięciu odmian *Medicago sativa* L., a mianowicie: u odmiany 'Australijskiej', 'Grimma', 'Kleszczewskiej', 'Miechowskiej' i 'Warminskiej' (rys. 1 - 10).

W stadium diakinezy i metafazy pierwszego podziału mejotycznego obserwowano zawsze koniugujące ze sobą chromosomy w postaci biwalentów (rys. 6 - 10, 18, 19, 31, 44, 45, 57, 58, 70, 71).

Komórki tapetum u badanych form były jednojądrowe o jądrach diploidalnych, a tapetum było typu sekrecyjnego (rys. 11b, 12).

W stadium premejotycznym komórki macierzyste pyłku ulegały degeneracji (rys. 13 - 15). W degenerujących komórkach macierzystych pyłku nie obserwowano podziałów mejotycznych.

W pozostałych przy życiu komórkach macierzystych pyłku podziały mejotyczne zachodziły normalnie (rys. 18 - 26, 31 - 40, 44 - 52, 57 - 65, 70 - 79).

Obserwowano również u wszystkich badanych odmian degenerację tetrad mikrospor (rys. 16, 17), jak i pierwotnych ziarn pyłku.

Procentowo degenerowanie komórek macierzystych pyłku, tetrad mikrospor i pierwotnych ziarn pyłku przedstawiało się następująco: u odmiany 'Australijskiej' około 17%, u odmiany 'Warmińskiej' około 20%, u odmiany 'Kleszczewskiej' około 23% i u odmiany 'Grimma' około 30%.

Dojrzałe ziarna pyłku były trójjądrowe i zawierały duże jądro wegetatywne i dwa jądra plemnikowe otoczone cienką warstwą własnej cytoplazmy (rys. 43, 56, 69, 84).

Przeprowadzone badania nie wykazały przyczyn, które by były powodem niskiej płodności u odmian *M. sativa*. Przyczyny te mogą tkwić w procesie zapylania i zapłodnienia, rozwoju zarodka i bielma lub braku odpowiedniej ilości pyłku przy niedostatecznej liczbie zapylaczy w pewnych określonych warunkach środowiska i są przedmiotem dalszych badań.

(Wpłynęło dn. 2.11.1970 r.)

Praca częściowo finansowana przez V Wydział PAN.

SUMMARY

Five varieties of *Medicago sativa* L. ('Australian', 'Grimma', 'Kleszczewska', 'Miechowska' and 'Warmińska') were found to have $n = 16$ and $2n = 32$ chromosomes (Figs 1 - 10).

At the stage of diakinesis and metaphase of the first meiotic division, conjugating chromosomes in the form of bivalents were always observed (Figs. 6 - 10, 18, 19, 31, 32, 44, 45, 57, 58, 70, 71).

The tapetal cells of the studied forms were mononucleate with diploid nuclei, and the tapetum itself was of the secretional type (Figs. 11 b, 12).

At the premeiotic stage some of the mother pollen cells underwent degeneration (Figs. 13 - 15). In the degenerating pollen mother cells no meiotic divisions were observed. In the surviving pollen mother cells, meiotic divisions were found to be normal (Figs. 18 - 26, 31 - 40, 44 - 52, 57 - 65, 70 - 79).

In all the varieties under study the degeneration of both microspore tetrads (Figs. 16, 17), and original pollen grains was also observed.

The degeneration of pollen mother cells, microspore tetrads, and original pollen cells in the respective varieties was as follows; in 'Australian' some 17% for each degeneration, in 'Warmińska' some 20% in 'Kleszczewska' some 23%, and in 'Grimma' some 30% for each degeneration.

The mature pollen grains were trinucleate; each of the grains had a large vegetative nucleus and two spermatozoon nuclei surrounded by a thin layer of its own cytoplasm (Figs. 43, 56, 69, 84).

The present studies did not reveal any causes responsible for the low fertility of the varieties of *M. sativa*. These causes may be inherent in the pollination and fertilization processes in the embryosac, embryo and endosperm development or in the scarcity of pollen combined with an insufficient number of pollinators under definite conditions. Studies are in progress on the causes in question.

LITERATURA

- Cebrat J., 1967, Preliminary embryological investigations on the cause of lowered fertility of *Medicago media* Pers. var. 'Kleszczewska', Acta Agrobot., 20:71 - 86.
- Cebrat J., 1969, Development of polyploid pollen grains in alfalfa (*Medicago media* Pers.), Acta Soc. Bot. 38:483 - 392.
- Cooper D. C., 1935, Macrosporogenesis and embryology of *Medicago*, Jour. Agric. Res., 51:471 - 477.
- Cooper D. C., 1936, Chromosome numbers in the *Leguminosae*, Amer. Jour. Bot., 23:231 - 233.
- Cooper D. C., 1939, Artificial induction of polyploidy in alfalfa, Amer. Jour. Bot., 26:65 - 67.
- Cooper D. C., Brink K. A., Albrecht H. R., 1937, Embryo mortality in relation to seed formation in alfalfa (*Medicago sativa*), Am. Jour. Bot., 24:203 - 213.
- Elders A. T., 1926, Some pollination and cytological studies of sweet clover, Sci. Agr., 6:360 - 365.
- Evans A. M., 1955, The production and identification of polyploids in red clover white clover and lucerne, New Phytol., 54:149 - 162.
- Frandsen K. J., 1945, Iagttagelser over polyploide Former av nogle Kulturplanter, Tidskr. Planteavl., 49:445 - 496.
- Fryer J. R., 1930, Cytological studies in *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonella*, Canad. Jour. Res., 3:3 - 50.
- Fyfe J. L., 1957, Relational incompatibility in diploid and tetraploid lucerne, Heredity, 11:286.
- Ghimpu V., 1928, Studies in North American violets. I. General considerations, Vermont Agric. Exp. Sta. Bull., 279:1 - 18.
- Ghimpu V., 1929 a, Recherches chromosomiques sur les luzernes, vignes, chènes et orges., XIV Congr. Int. Agr. Bucarest. Actes, 4:557 - 563.
- Ghimpu V., 1929 b, Sur la caryologie du genre *Medicago*, Bul. Agr. Roumania, 10:175 - 178.
- Ghimpu V., 1930, Recherches cytologiques sur les gengres; *Hordeum*, *Acacia*, *Medicago*, *Vitis* et *Quercus*, Arch. Ant. Microsc., 26:135—249.
- Ghimpu V., 1941, Sur les recherches caryologiques des plantes, C. r. Acad. Sci. Roumania, 5:88 - 95.
- Giles N., 1939, The effect of dehydration on microsporogenesis in *Tradescantia*, Amer. J. Bot., 26:334 - 339.
- Grun P., 1951 a, Variations in the meiosis of alfalfa, Am. Jour. Bot., 38:475 - 482.
- Johansen D. A., 1950, Plant Embryology. Embryology of the *Spermatophyta* Waltham, Mass. USA. Chr. Bot. Comp.
- Julen G., 1944, Investigations on diploid and tetraploid lucerne, Hereditas, 30: 567 - 583.
- Kawakami J., 1930, Chromosome numbers in *Leguminosae*, Bot. Mag. Tokyo, 44:319 - 328.
- Kazimierski T., 1970, Mejoza i sporogeneza u roślin męskojałowych lucerny i koniczyny. Ref. wygł. na III Zjeździe Pol. Tow. Genet. w Krakowie.
- Ledingham G. F., 1940, Cytological and development studies hybrids between *Medicago sativa* and a diploid form of *M. falcata*, Genetics, 25:1 - 15.
- Lesins K., 1952, Some data on the cytogenetics of alfalfa, Jour. Hered. 43: 287 - 291.
- Lesins K., 1954 a, Procedure to facilitate chromosome counts in difficult plant material, Stain Tech., 29:261 - 264.

- Lesins K., 1954 b, Susceptibility of some diploid alfalfas to bacterial wilt, *Agron. Jour.*, 46:251 - 252.
- Lesins K., 1955, Techniques for rooting cuttings chromosome doubling and flower emasculation in alfalfa, *Canad. Jour. Agr. Sci.*, 35:58 - 67.
- Lesins K., 1956 a, Interspecific hybrids between alfalfa, *Medicago sativa* L., and *M. džhawakhetica* Bordž., *Agron. Jour.*, 48:583.
- Lesins K., 1956 b, Somatic flower mutations in alfalfa, *Jour. Hered.*, 47:171 - 179.
- Lesins K., 1957, Cytogenetic study on a tetraploid plant at the diploid chromosome level, *Canad. Jour. Bot.*, 35:181 - 196.
- Lesins K., 1958, Progenies from a cross *Medicago džhawakhetica* × *M. sativa*, *Proc. X Int. Congr. Genet. II.*, 165.
- 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*, McGraw. Hill. Book Comp. Inc. New York, Toronto, London.
- Moriya A., Kondo A., 1950 b, Cytological studies of forage plants. II. Legumes. *Jap. Jour. Genet.*, 25:131 - 134.
- Nicoloff H., 1963, Citologiczeskogo i embriologiczeskogo prouczwanie na *Medicago sativa* L. ($2n = 4x = 32$), *Bullet. Inst. Cult. Plant.*, 16, 57 - 70.
- Nilsson F., Andersson E., 1941, Polyploidi hos släktet *Medicago*, *Sv. Utsädes-för Tidskr.*, 1941, 363 - 382.
- Nilsson F., Andersson F., 1943, Polyploidy in the genus *Medicago*, *Hereditas*, 29:197 - 198.
- Rausch H., 1964, Ursachen der Infertilität der Lucerne (*Medicago medie* Pers.). Untersuchungen über Korrelation zwischen samenetrags bedingenden Factoren. *Z. Pfl. Züchtung*, 51:141 - 166.
- Reeves R. G., 1930, Nuclear and cytoplasmic division in the microsporogenesis of alfalfa, *Amer. Jour. Bot.*, 17:29 - 40.
- Romanenko V., 1937, Zytologisch-embryologische Studie über einige Futterpflanzen aus der Familie der Leguminosen, *Zhurn. Inst. Bot. Akad. Nauk URSS*, 11:3 - 39.
- Sax K., 1937, Effect of variation in temperature on nuclear and cell division in *Tradescantia*, *Amer. J. Bot.*, 24:218 - 225.
- Saunoris J., 1957 a, La génétique de la luzerne (*Medicago sativa*). I., *Révue l'Oka*, 31:152 - 161.
- Saunoris J., 1957 b, La génétique de la luzerne (*Medicago sativa*). II., *Révue d'Oka*, 31:174 - 182.
- Schelhorn M., 1946, Zur cytogenetik von *Medicago falcata* L., *Züchter*, 17/18: 92 - 93.
- Schnarf K., 1929, *Embryologie der Angiospermen*, Berlin.
- Schnarf K., 1931, *Vergleichende Embryologie der Angiospermen*, Berlin.
- Schürhoff P. N., 1929, *Die Zytologie der Blütenpflanzen*, Stuttgart Verl. von Fer. Eecke.
- Senn H., 1938 b, Chromosome number relationships in the *Leguminosae*, *Bibliogr. Genet.*, 12:175 - 345.
- Sinskaya E. N., 1940, Phylogenetic taxonomy as a basis for genetic and breeding work- illustrated by *Medicago*, *Zeitschr. Vererb.*, 78:399 - 417.
- Sinskaya E. N., 1959, Diploid and tetraploid species of wildgrowing alfalfa in the flora of the USSR, *Canad. Jour. Bot.*, 37:1136 - 1138.
- Sinskaya E. N., Maleyeva Z. P., 1959, Ploidnost'u mnogoletnich vidov lyut-scerny, *Bot. Zhurn.*, 44:1103 - 1113.

- Stählin A., 1928, Ein zytologischer Beitrag zur Frage nach den Verwandtschaftsbeziehungen der Saatlucerne (*Medicago sativa* L.), Pflanzenbau, 5:152 - 153.
- Skovsted A., 1939, Cytological studies in twin plants, C. r. Trav. Lab. Carlsorg Sér. Physiol., 22:427 - 445.
- Tischler G., 1927 a, Pflanzliche Chromosomen-Zahlen, Tab. biol., 4:1 - 83.
- Tschechow W., 1930, Karyologisch-systematische Untersuchungen des Tribus Galegeae, Fam. Leguminosae, Planta, 9:673 - 680.
- Tschechow W., 1933, Karyosystematische Analyse des Tribus Trifoliae D. C. (Fam. Leguminosae Juss.), Bull. Appl. Bot. Genet. Plant. Breed. II., 1:119 - 143.
- Tome G. A., 1947, Dos casos de poliploidia en alfalfa (*Medicago sativa* L.), Revista Fac. Agr. Vet. Buenos Aires, 11:299 - 307.
- Wipf L., 1939, Chromosome numbers in root nodules and root-tips of certain Leguminosae, Bot. Gaz., 101:51 - 67.