

Tetraploid Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.)'nde apomiktik gelişme

Gönül ALGAN, H. Nurhan BAKAR BÜYÜKKARTAL

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.02.1999

Özet: Bu çalışma doğal tetraploid Çayırüçgülü E2 çeşidinde apomiktik gelişmenin tohum oluşumunu ne kadar etkileyebileceğini saptamak amacıyla yapılmıştır. Sonuçlara göre, *Taraxacum* tipi ve *Ixeris* tipi gelişmeye benzer bazı gelişme evreleri elde edilmiştir. Aposporik olarak embriyo kesesinin meydana gelmediği ancak diplosporik olarak gelişebileceği sonucuna varılmıştır.

Apomictic Development in Tetraploid Red Clover (*Trifolium pratense* L.)

Abstract: This study was carried out in order to determine to what extent apomictic development would affect seed formation in the natural tetraploid red clover variety E2. Some *Taraxacum*-type and *Ixeris*-type development, was determined. It was concluded that embryo sac development did not occur through aposporous development whereas it could occur through diplosporous development.

Giriş

Son yüzyılda dünya nüfusunun hızla artışı, beslenme sorunlarının daha çok artmasına yol açarak, bitkisel ve hayvansal ürünlere duyulan gereksinmeyi artırmıştır. Çağdaş düzeyde beslenmenin temeli olması gereken, hayvansal protein üretimine ilişkin sorunların en önemlilerinden birini yem üretimi konusu oluşturmaktadır. Zira hayvanların iyi gelişebilmesi için başta gelen sorun, kaliteli ve ekonomik yem üretimidir.

Bir tarım ve hayvancılık ülkesi olan ülkemizde de yem bitkilerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bugün tarımda kullandığımız yem bitkileri sınırlı sayıdadır. Oysaki yapılan inceleme ve araştırmalar bir çok yem bitkisine ait en üstün örneklerin ülkemizin çeşitli bölgelerinde doğal bitki örtüsü içinde bulunduğunu göstermektedir. Buna örnek olabilecek bir bitki de baklagiller familyasından *Trifolium pratense* L. (Çayırüçgülü)'dir.

Trifolium çoğunluğu kuzey yarım küresinin ılık ve nemli bölgelerinde yerli bitki olan pekçok türü kapsar, ancak ziraat bakımından önemli olan 25 kadar türü bulunmaktadır. Asıl gen merkezinin Anadolu ve Güneydoğu Avrupa olduğuna inanılır. Bazıları Güney Amerika ve Afrika'dan da orijini alır.

Ülkemizde doğal olarak yetişen tetraploid Çayırüçgülü hem tetraploid bitki özellikleri hem de yüksek protein kapasitesine sahip olması bakımından ekonomik değeri fazla olan bir yem bitkisidir (1).

Çayırüçgülü'nün İngiltere'de yıllık tohum sarfiyatı 300 tondur (2). Bu rakam İsveç'te 3700 ton ve Finlandiya'da 800 tondur (3). A.B.D. de ise, her yıl sadece ıslah edilmiş "Kenland" Çayırüçgülü'ne ait 9476 tohum ekilmektedir (4). Anavatanının ülkemiz olduğu yabancı araştırmacılar tarafından kabul edilmiş olmasına karşılık, tarımsal işletmelerimizde Çayırüçgülü'nün yetiştirilme çabalarına gereken önem verilmemiştir.

Bu bitki üzerinde devam eden çalışmalarımızla (5,6) bitkinin tarımımıza kazandırılması amaçlanmaktadır.

Bazı bitkilerde eşeyli üremenin yerini apomiksis denilen bir çeşit eşeysiz üreme alır. Apomiksis terimini ilk defa kullanan Winkler'e göre, apomiksiste mayoz bölünme ve çekirdek birleşmesi olmaz (7). Nogler (7) angiospermlerde apomiksisin sadece tohumlarla eşeysiz üremeyi yani agamospermiyi kapsadığını belirtmektedir. Araştırmacı agamospermiyi sporofitik apomiksis ve gametofitik apomiksis diye ikiye ayırmıştır. Gametofitik apomiksis diplospori ve aposporiyi içerir. Diplospori ve apospori tohum taslağı gelişiminin erken evresinde başlar. Megaspore ana hücrenin farklılaşması sırasında diplospori, megaspore ana hücresi farklılaştıktan sonrada apospori durumu meydana gelebilir. Apospori ve diplosporida de gametofitdeki kromozom sayısı indirgenmemiştir (8).

Taraxacum tipi diplosporida megaspore ana hücresi bölünmeye mayoz profazına benzer şekilde başlar ve bir

dereceye kadar kromozomlarda eşleme de görülebilir. Fakat hiçbir zaman tam bir eşleşme olmaz ve univalentler metafaz I'de iğ üzerine dağılırlar. Bunun sonucunda kromozomlar kutuplara dağılmaz ve restitüsyon nukleusu oluşur. II. bölünme indirgenmemiş kromozom sayısı ile devam eder ve sonuçta sitokinez meydana gelir. İndirgenmiş bir tetrad yerine indirgenmemiş bir dyad teşekkül eder. Restitüsyon nukleuslu megaspor ana hücresi embriyo kesesi halinde gelişebilir veya bir mitoz ile ikiye ayrılır ve meydana gelen hücrelerden biri körelir, diğeri embriyo kesesini oluşturur (9).

Okabe (10) *Ixeris* tipi diplosporide, megaspor ana hücresinin bölünmesi sırasında kromozom çiftlerinin görülmediğini, anafazda kromozomların iğ üzerinde dağıldığını ve kutuplara çekilmediğini belirtmiştir. Sonuçta restitüsyon nukleusunun oluştuğunu kromozom sayısının indirgenmediğini ve bu nukleusun ardışık üç mitoz bölünme geçirerek 8 nukleuslu embriyo kesesini verdiğini bildirmiştir.

Apomiktik gelişme gösteren bitkilerin çoğu melez kökenli ve poliploidir. Melezleme çalışmaları apomiksizin genetik yönüne işaret etmiş ve apomiksizin ressesif genler tarafından kontrol edildiğini ortaya çıkarmıştır (7,8,11). Son yıllarda hem diplosporik apomiksiz hem de aposporik apomiksiz konusundaki araştırmalarda ilerlemeler kaydedilmiştir (12-20).

Bu çalışma doğal tetraploid Çayırüçgülü'nde apomiktik gelişmenin tohum oluşumu üzerinde etkili olup olamayacağını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Elçi (21) tarafından Erzurum'un Tortum yöresinden alınan ve ($2n=28$) kromozumlu bir bitki olduğu anlaşılan doğal tetraploid *T. pratense* (Çayırüçgülü) E2 çeşidine ait tohumlar kullanıldı. Bitkiler tarla şartlarında yetiştirildi. Materyal alma işlemine bitkiler tomurcuklanma devresine girdiğinde başlandı ve çiçeklenmenin sonuna kadar devam edildi.

Işık ve elektron mikroskobu çalışmaları için, tomurcuk başlangıcı (integümentler henüz belirleşmiş), tomurcuk (integümentler farklılaşmaya başlamış), ileri tomurcuk evresi (integümentler gelişmiş fakat nusellusu tamamen kuşatmamış durumda), ve çiçek (integümentler nusellusu kuşatmış durumda)'den örnekler alınmıştır. İncelenen tohum taslağı sayısı 356 adettir. Örnekler, ışık mikroskobu çalışması için alkol-asetik asit (3:1)'de tespit edilmiş ve parafine gömülen materyallerden 8-12 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler Heidenhain Fe'li hematoksilen ile boyanmıştır.

Elektron mikroskobu çalışmaları için örnekler önce % 3'lük glutaraldehit sonra da % 1'lik osmium tetraoksit ile tespit edilmiş, dehidrasyon ve doyurma işlemlerinden sonra örnekler epon 812 (22) içine gömülmüştür. İnce ve yarı ince kesitler ultramikrotomda cam bıçaklar ile alınmış ve uranil-asetat (23) ve kurşun-sitrat (24) ile boyandıktan sonra Jeol CXII transmisyon elektron mikroskobunda incelenmiştir.

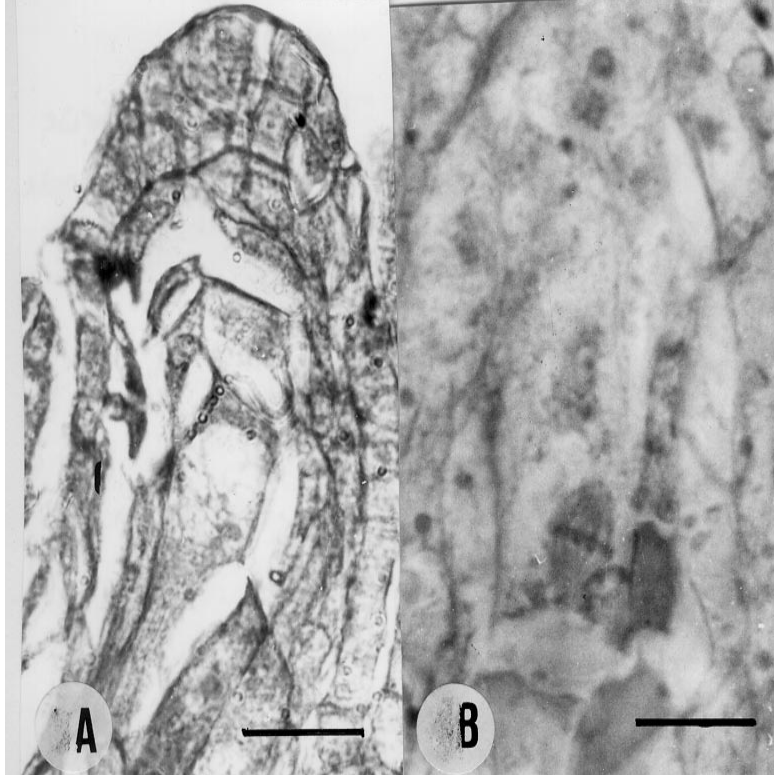
Sonuçlar ve Tartışma

İntegümentlerin henüz belirlemeye başladığı tomurcuk aşamasındaki örneklerin % 23,7'inde tohum taslağının kalaza tarafındaki nusellus dokusunda bazı hücrelerin gelişerek, megaspor ana hücresinin boyutuna ulaştığı ve tohum taslaklarının bazısında da bu hücrelerin bölündüğü gözlenmiştir. Nusellusdan gelişen bu köken hücrelerde büyük bir çekirdek ve çekirdekçik bulunmaktadır. Sitoplazma ise yoğun bir şekilde ve vakuollüdür. Megaspor ana hücresi gibi farklılaşan bu hücrelerde aposporik oluşumun başlangıcıdır.

Bu çalışmada da tomurcuk örneklerinin bir kısmında hem *Taraxacum* tipi hem de *Ixeris* tipi dislosporiye benzer gelişme kademelerinin mevcut olduğu tespit edilmiştir. *Taraxacum* tipi dislosporiye benzer gelişme sırasında yeniden oluşan nukleusun bölündüğü (şekil 1 A-C), sonuçta bir dyad'ın teşekkül ettiği (şekil 1D) gözlenmiştir. *Ixeris* tipine benzer gelişmede ise, yeniden oluşan nukleusun meydana geldiği (şekil 2A) ve bölünerek iki nukleusa sahip bir hücrenin oluştuğu (şekil 2B, C) saptanmıştır.

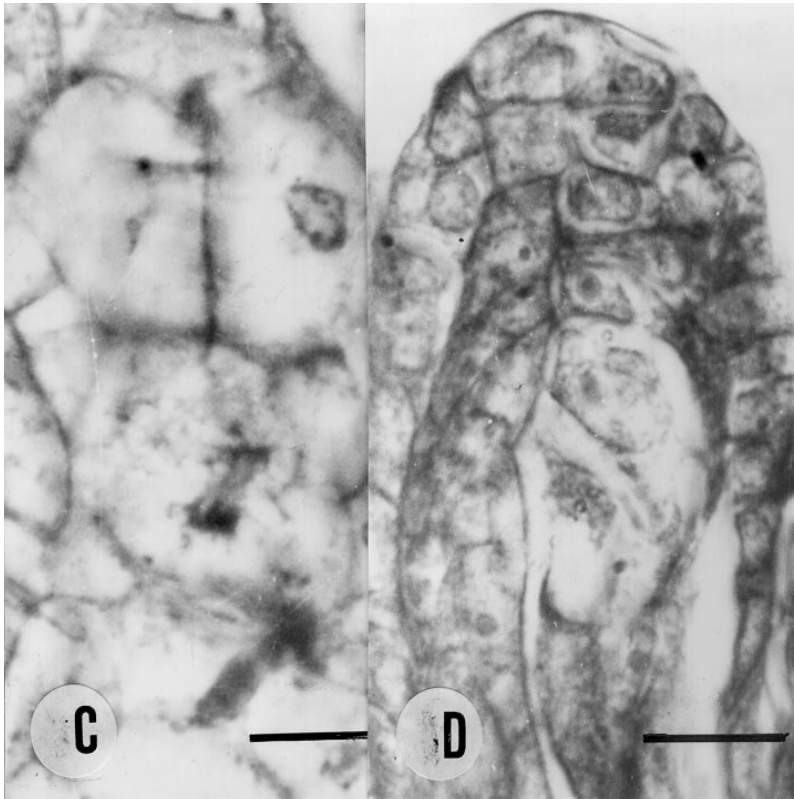
Nusellusdan gelişmekte olan bu köken hücrelerin çevresindeki nusellus hücrelerinin tamamına yakınının bozulmuş olduğu tespit edilmiştir. Bu tip tohum taslaklarında hücreler arasında meydana gelen boşluklar hücrelerin birbirleriyle ilişkilerini kesmektedirler. Bu tohum taslakları da dış ve iç integümentlerin normal geliştiği tohum taslakları gibi görünmekte ve anormal gelişen integümentlere rastlanmamıştır.

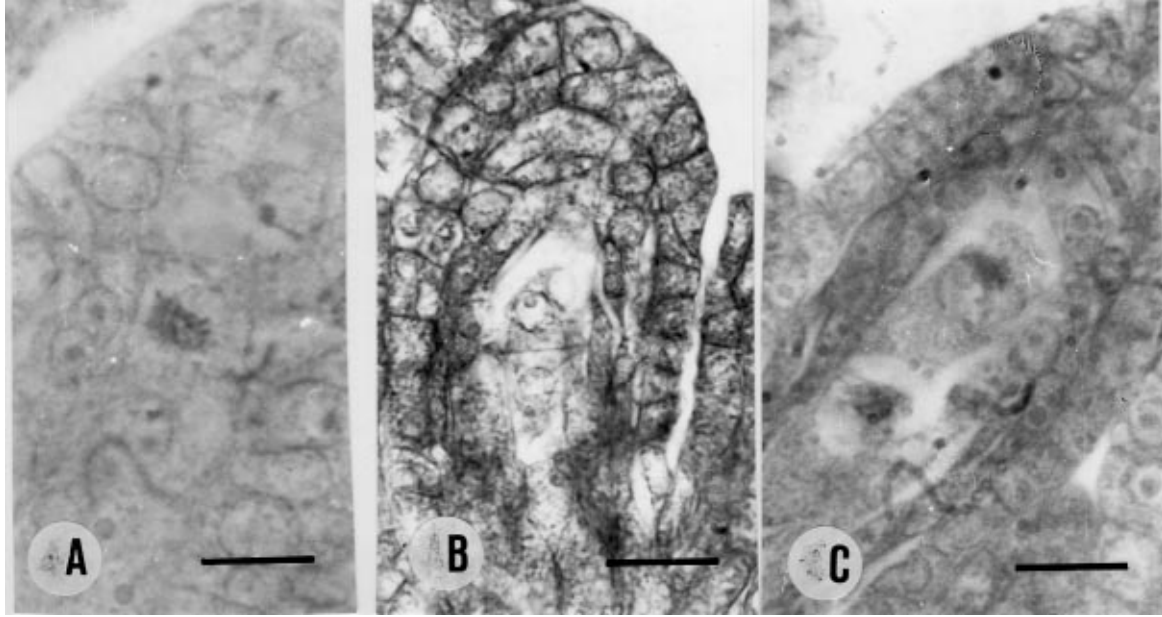
Bizim gözlemlerimizde olduğu gibi Jongedijk (14)'de *Solanum*'un diploid melez türlerinde yaptığı çalışmasında, megaspor ana hücrelerini çeviren nusellus dokusunun gelişiminin düşük oranda olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı tür içi ve türler arası melezlerde çok sık gözlenen kromozom homolojisinin bulunmaması profaz I'de kromozomların eşleşmemesi veya kiyazmanın gecikmesi ya da yetersiz olması sebebiyle megasporogenezde düzensizliklerin meydana gelebileceğini, ayrıca desinapsis, asinapsis ve genom açısının yeniden oluşan megasporların teşekkülünde gerekli olduğunu belirtmiş ve bunların



Şekil 1.

Çayırüçgülü bitkisinde *Taraxacum* tipi diplosporiye benzer gelişme kademeleri. A. Yeniden oluşan nukleus. Bar= 10 μm . B,C. Yeniden oluşan nukleusda mitoz. Bar=10 μm . D. Dyad. Bar=10 μm .





Şekil 2. Çayırüçgülü bitkisinde *Ixeris* tipi diplosporiye benzer gelişme kademeleri. A. Yeniden oluşan nükleusda mitoz Bar= 10 µm. B,C. İki nükleuslu embriyo kesesi. Bar=10µm.

diplosporik apomiksisi teşvik ettiği sonucuna varmıştır.

Çalışmalarımız sırasında aynı tohum taslağında teşekkül etmiş olan iki megaspor ana hücrenin de aynı zamanda bölünmeye başlaması sebebiyle muhtemelen birbirleriyle rekabet ettikleri ve daha sonra da birbirlerini engelleyerek gelişmenin geri kalmasına sebep oldukları söylenebilir.

İleri tomurcuk evresinde alınan ve incelenen tohum taslaklarının bazısında kalaza tarafında gelişme gösteren aposporik köken hücrede bölünememiş büyük bir çekirdeğin olduğu ve kromozomların çekirdek zarının çevresinde yoğunlaşmış oldukları (şekil 3A) görülmüştür. İncelenen örneklerin bazısında ise, kalaza tarafında nusellusda iki çekirdekli iyi gelişmemiş bir embriyo kesesinin mevcut olduğu tespit edilmiştir (şekil 3B). Bunlar muhtemelen gelişmeden bu evrede kalmış olan çekirdeklerdir. İki çekirdekli kesenin ise, neden gelişmediği anlaşılamamıştır.

Ancak Krupko (25), *Trifolium alexandrinum*'da embriyo kesesinin tek çekirdekli evredeyken nusellus hücreleri tarafından baskılandığını belirtmiştir.

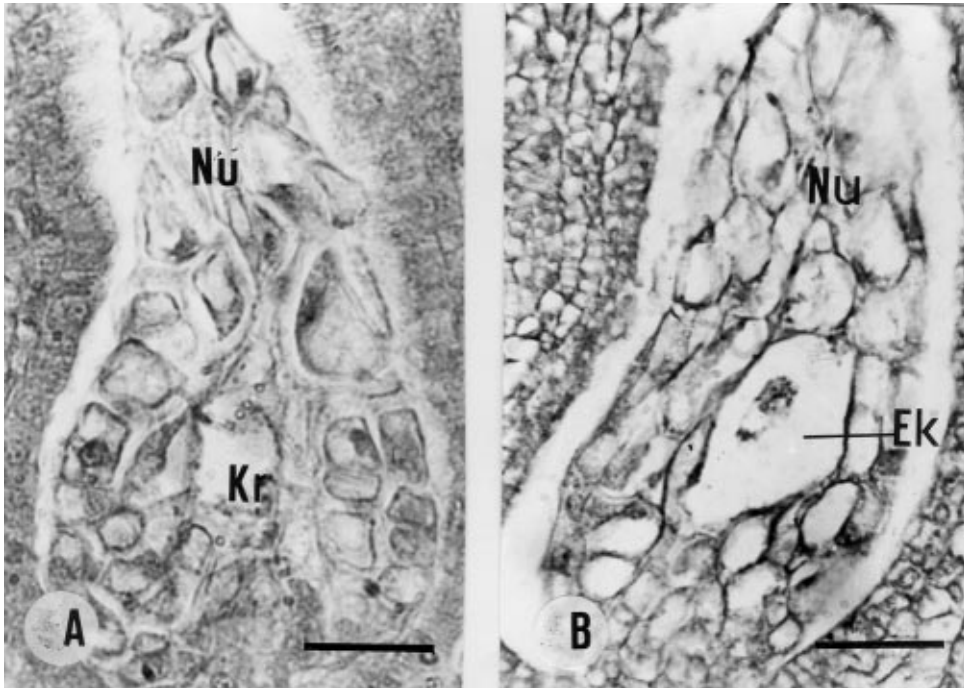
Rembert (26) ise, *Trifolium repens*'de erken gametofit gelişiminin hızlı olmamasının nusellus hücrelerinin gelişmesine izin vererek, nusellusun çok hızlı büyüdüğünü bu olayın kısmen embriyo kesesi teşekkülünde başarısızlığa sebep olduğunu ve

baklagillerdeki düşük tohum tutumunu açıklayabileceğini ifade etmiştir.

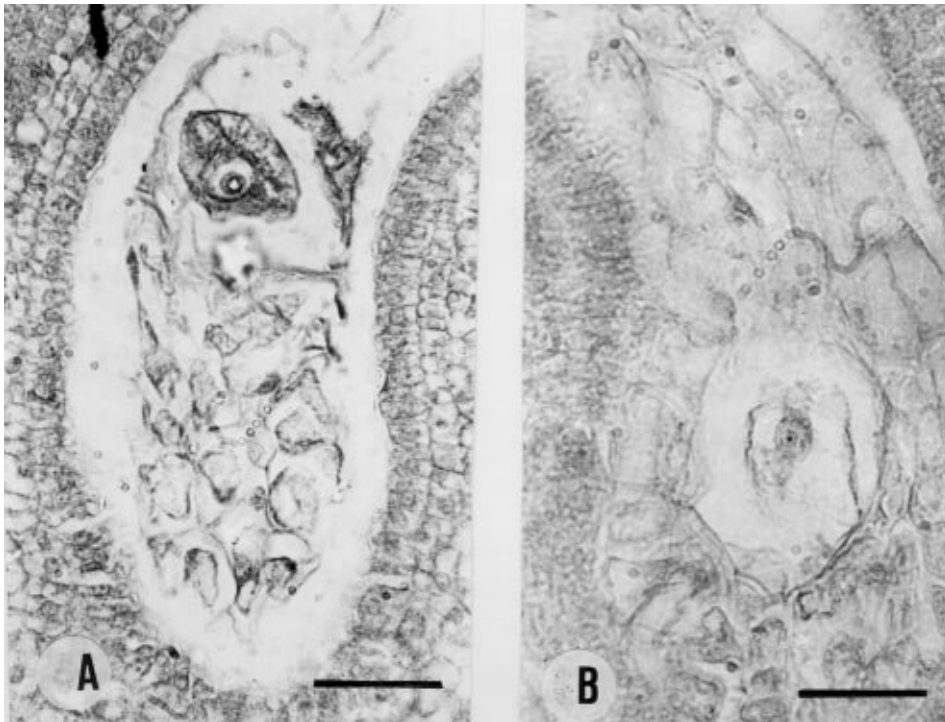
Çiçek örneklerinin bir kısmında, kalaza tarafına yakın aposporik gelişme gösteren hücrede büyük bir çekirdeğin mevcut olduğu (şekil 4A), fakat çekirdeğin bozulduğu (şekil 4B) gözlenmiştir. İncelediğimiz örneklerde aposporik olarak gelişme gösteren köken hücrelerin embriyo kesesini meydana getirdiği görülmemiştir. Aynı şekilde çiçek örneklerinin bir kısmında da yine kalaza tarafında iyi gelişmemiş bir embriyo kesesi ile nusellus dokusunun mevcut olduğu gözlenmiştir. Bu gelişme döneminde incelenen örneklerde muhtemelen çekirdeklerin bu evrede kalarak, nusellus hücrelerinin çoğalmasına olanak tanıdığı düşünülebilir.

Fedortschuk (27) *T. pratense* L.'de tohum taslağı ve tohum gelişimini incelemek amacıyla yaptığı çalışmasında; dişi organ gelişmesinin farklı evrelerde anormallikler ve sapmalar gösterdiğini belirtmiştir. Araştırmacı tohum taslaklarında iyi gelişmiş bir embriyo kesesinin yanında kalaza tarafında bazı ilave keselere de rastladığını bu tip embriyo gelişimini gözlemediğini bildirmiştir.

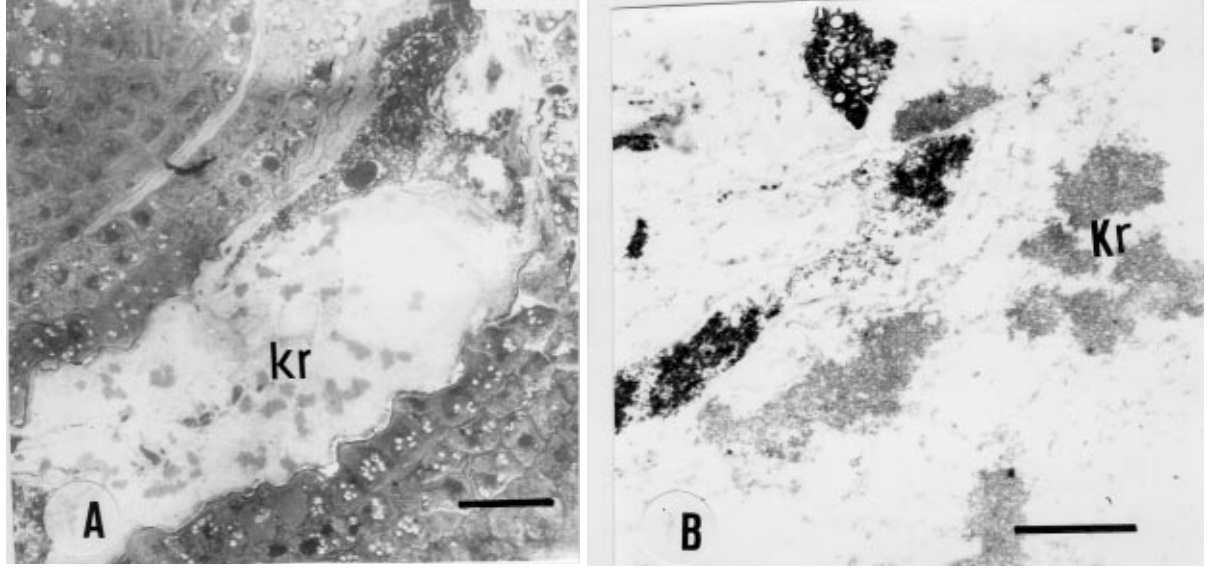
Diploid *T. pratense* L.'de erkek ve dişi gametofit gelişimini inceleyen Hindmarsh (28) ise, genellikle aynı tohum taslağında iki embriyo kesesinin bulunduğunu ve genellikle bunlardan birisinin somatik apospori ile geliştiğini belirtmiştir.



Şekil 3. Çayırüçgülu bitkisinde kalaza tarafında gözlenen aposporik gelişme. A. Nusellusdan (Nu) gelişen aposporik başlangıç hücresinde bölünemeden kalmış olan çekirdekteki kromozomlar (Kr), Bar= 25 µm. B. kalazada gelişmeden kalmış olan iki çekirdekli embriyo kesesi (Ek) Bar= 25 µm.



Şekil 4. Çayırüçgülu bitkisinde kalaza tarafında aposporik olarak gelişme gösteren büyük çekirdekli hücre, Bar= 25 µm. B. Aposporik olarak gelişmeye başlamış fakat bozulmuş olan çekirdek, Bar= 25 µm.



Şekil 5. Çayırüçgülü bitkisinde diplosporik ve aposporik gelişme gösteren embriyo keselerindeki bozulmalar. A. Aynı tohum taslağında hem mikropil hem de kalaza tarafında gelişmemiş embriyo keselerinde bozulan kromozomlar (Kr), Bar= 25 µm. B. İleri derecede bozulmuş ve vakuolleşmiş kromozomlar (Kr), Bar= 25 µm.

Bulgularımıza göre, aposporik embriyo kesesini meydana getirmek üzere, nusellusdan farklılaşan bu köken hücrelerin bir çoğunda daha ileri gelişme evrelerinde elektron mikroskobu ile yaptığımız çalışmalar sırasında bölünmekte olan hücrede kromozomların bozuldukları gözlenmiştir (Şekil 5A). Bu tip tohum taslaklarında mikropil tarafında elektronca yoğun bir sitoplazma kitlesi mevcuttur. Kromozomlar şekil 5A'da da görüldüğü gibi tohum taslağının merkezine dağılmış durumdadırlar ve kromozomlarda vakuolleşme mevcuttur (şekil 5B).

Bilindiği gibi bir çok bitkide yüksek ploidi seviyesine sahip ve melez kökenli türlerde apomiksise rastlanmaktadır (7,8,11).

Koltunow (8), aposporik embriyo keselerinin, megaspor ana hücresinin farklılaşmasını takiben nusellusdan farklılaşan hücrelerden teşekkül ettiğini ve bu aposporik başlangıç hücrelerinin seksüel megaspor ana hücresi gibi farklılaştığını ve aposporik başlangıç

hücrelerinin mitoz bölünme ile indirgenmemiş embriyo keselerini meydana getirdiğini ifade etmiştir. Diplosporik gibi aposporik başlangıç hücreleri de mitoz bölünme ile indirgenmemiş embriyo keselerini meydana getirirler. Araştırmacı aposporik embriyo keselerinde gelişmenin, seksüel embriyo keselerine göre daha hızlı olduğunu çünkü bunlarda mayoz bölünmenin meydana gelmediğini ileri sürmüştür.

Crane ve Carman (15), apomiktik gelişme gösteren *Elymus rectisetus*'da yaptıkları çalışmalarında, megasporada gözlenen bozulma belirtilerinin özellikle çekirdekçiğin kaybolması, plazmolizin artması ve sonuçta nuklear bozulmanın meydana gelerek, çekirdeğin kaybolması ve sitoplazmanın büzülmesi şeklinde olduğunu belirtmişlerdir.

Elde edilen sonuçlardan da anlaşılacağı gibi; doğal tetraploid Çayırüçgülü'nde apomiktik gelişme ile tohum oluşumunun sağlanamadığı gibi rekabete de sebep olup esas megasporun gelişmesine de engel olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Wilsie, C. P., Red clover and Alsike clover. In Hughes, H. D., Health, M. E., Metcalfe, D. S. (Editors), Forages. The Iowa State Univ. Press. Ames. Iowa, U. S. A. 136-149, 1967.
2. Cooper, J. P., Annual Report. Welsh Plant Breeding Station, University of Wales, 256 pp, Aberystwyth, 1983.
3. St. Pierre, J. C., Bullen, M. R., Bulletin D'information Sur le Genre Phleum. Station de Recherches, p. 13, Canada, 1975.
4. Hughes, H. D., Health, M. E., Metcalfe, D. S., Forages, The Sci. Grassl. Agric. The Iowa State Univ. Press, U. S. A. 982p, 1967.
5. Algan, G., Bakar, H. N., Light and electron microscopic examination of the embryo and endosperm development in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. Israel J. Plant Sci., 44, 273-288, 1996.
6. Algan, G., Bakar, H. N., Ultrastructure of mature embryo sac in the natural tetraploid of Red clover (*Trifolium pratense* L.) that has a very low rate of seed formation. Acta Soc. Bot. Pol., 66, 145-152, 1997.
7. Nogler, G. A., Gametophytic Apomixis Embryology of Angiosperms, Springer, Verlag, Berlin-Heidelberg, Johri, B. M., p. 475-517, 1984.
8. Koltunow A. M., Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis of fertilization in ovules. The Plant Cell, 5, 1425-1437, 1993.
9. Battaglia, E., Ricerche sulla parameiosi restituzionale nel genere *Taraxacum*. Caryologia 1,1-47, 1948.
10. Okabe, S., Parthenogenesis bei *Ixeris dentata*. Bot. Mag. (Tokyo), 46, 518-523, 1932.
11. Nogler, G. A., How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. Bot. Helv. 92, 13-22, 1982.
12. Hermesen, J. G., Breeding for apomixis in potato: Pursuing a utopian scheme Euphytica, 29, 595-607, 1982.
13. Pfeiffer, T. W., Bingham, E. T., Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of 2N egg and 4N pollen formation. Can. J. Genet. Cytol., 25, 107-112, 1983.
14. Jongedijk, E., The pattern of megasporogenesis and megagametogenesis in diploid *Solanum* species hybrids; its relevance to the origin of 2n-eggs and the induction of apomixis. Euphytica, 34, 599-611, 1985.
15. Crane, C. F., Carman, J. G., Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from Eastern Australia and New Zealand. Am. J. Bot., 74, 477-496, 1987.
16. Burson, B. L., Voigt, P. W., Sherman, R. A., Dewald, C. L., Apomixis and sexuality in Eastern Gamagrass. Crop Science, 30, 86-89, 1990.
17. Kojima, A., Nagato, Y., Diplosporous embryo sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*, Sex. Plant Reprod., 5, 72-78, 1992.
18. Czapik, R., Elementary apomictic processes in *Rubus* L. Acta Soc. Bot. Pol. 50, 201-204, 1981.
19. Czapik, R., Problems of apomictic reproduction in the families Compositae and Rosaceae. Folia Geobot. Phytotax., 31, 381-387, 1996.
20. Arthur, L., Ozias-Akins, P., Hanna, W. W., Female sterile mutant in Pearl millet: Evidence for initiation of apospory. Journal of Heredity, 84, 112-115, 1993.
21. Elçi, Ş., The utilization of genetic resource in fodder crop breeding, Eucarpia. Fodder Crop Section, 13-16 September, Aberystwyth, U. K. 1982.
22. Luft, J. H., Improvements in epoxy resin embedding methods, J. Biophys. Cytol., 9, 409-414, 1961.
23. Stempak, J. G., Ward, R. T., An improved staining method for electron microscopy. J. Cell Biol. 22, 697, 1964.
24. Sato, J. E., A modified method for lead staining of thin sections. J. Electron Microscopy, 16, 133, 1967.
25. Krupko, S., Megasporogenesis and development of the embryo sac in the Palestine variety of *Trifolium alexandrinum* L. Acta Soc. Bot. Pol., 42, 617-627, 1973.
26. Rembert, D. H., Ovule ontogeny, megasporogenesis and early gametogenesis in *Trifolium repens*. Am. J. Bot., 64, 483-488, 1977.
27. Fedortschuk, V. F., Development and organization of the embryo and seed of Red clover (*Trifolium pratense* L.). Moscow State Publ. Agric. Lit., 25, 1-9, 1944.
28. Hindmarsh, G. J., Gametophyte development in *Trifolium pratense* L. Aust. J. Bot., 12, 1-14, 1964.