

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL TETRAPLOİD
TRİFOLİUM PRATENSE L. (Çayırüçgülu)'DE
EMBRYO KESESİ GELİŞMESİ VE YUMURTA
TEŞEKKÜLÜNÜN İNCELENMESİ

Nurhan BAKAR

T. C.
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
Dokümantasyon Merkezi

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

1989
ANKARA

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL TETRAPLOİD
TRİFOLIUM PRATENSE L. (Çayırüçgülü)'DE
EMBRİYO KESESİ GELİŞMESİ VE YUMURTA
TEŞEKKÜLÜNÜN İNCELENMESİ

Nurhan BAKAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ..15.8.1989..... Tarihinde Aşağıdaki Juri Tarafından..100..(.....Yüz.....)
Not Taktir Edilerek Oy birliği/~~Oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gönül ALGAN.

(Danışman)



Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ



Doç. Dr. Mecit VURAL



ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

DOĞAL TETRAPLOİD TRİFOLİUM PRATENSE L. (Çayırüçgülü)'DE
EMBRYO KESESİ GELİŞMESİ VE YUMURTA
TEŞEKKÜLÜNÜN İNCELENMESİ

Nurhan BAKAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gönül ALGAN.
1989 Sayfa: 35

Juri : Prof. Dr. Gönül ALGAN
Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ
Doç.Dr. Mecit VURAL

Tohum bağlama oranı çok düşük olan ve vejetatif organlarının gelişmesi çok üstün görülen doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'de tohum bağlama probleminin nedenlerini açıklığa kavuşturmak amacıyla, dişi gametofit dölün gelişmesi ve yumurta hücrelerinin teşekkülü incelendi. Araştırmada doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. seçme klonlarından E2 çeşidine ait tohumlar kullanıldı.

Elde edilen sonuçlara göre: bu bitkide dişi organ gelişmesinin farklı gelişme safhalarından alınan örneklerde makrospor ana hücresinden itibaren, dişi gametofit dölün çeşitli gelişme safhaları incelendi. Bu safhaların büyük bir kısmında, embriyo kesesi gelişme bozuklukları ve dejenerasyonları tespit edildi. Örneklerin bir kısmında da her bir tohum taslağı içinde orijini farklı olan iki ayrı embriyo kesesi gelişmesi gözlemlendi. *Trifolium pratense* L.'de olgunluğa ulaşan embriyo keselerine oranla meydana gelen tohum oranının daha düşük olması bu bitkide, embriyo kesesi dejenerasyonlarının yanında dölleme başarısızlığının da tohum bağlama oranını etkileyebileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Trifolium pratense* L., Embriyo kesesi, Megasprogenez, megagametogenez, Embriyogenez.

ABSTRACT
Masters Thesis

THE STUDY OF THE DEVELOPMENT OF EMBRYO SAC
AND FORMATION OF EGG IN THE NATURAL TETRAPLOID
RED CLOVER (*Trifolium pratense* L.)

Nurhan BAKAR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied
Sciences Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gönül ALGAN.

1989, Page: 35

Jury : Prof. Dr. Gönül ALGAN

Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ

Assoc. Prof. Dr. Mecit VURAL

The development of female gametophyte germ and formation of egg cell were studied in order to clarify the causes of the problems of seed formation in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. which has a very low rate of seed formation and a superior development of vegetative organs. The seeds of the variety E2 of the selected clones of the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. were used in this research.

According to the results obtained, various developmental phases of female gametophyte germ from the intermediary cell of the megaspore were studied on the samples taken from different developmental phases of the development of the female organ in this plant. Developmental disorders and degeneration of the embryo sac were determined in most of these phases. Development of two different embryo sac with different origins in that the rate of seed formation is lower than the embryo sacs reaching maturation in *Trifolium pratense* L. shows that failure to fertilize as well as degenerations of embryo sacs may of fit the rate of seed formation.

KEY WORDS: *Trifolium pratense* L. Female gametophyte, Megasporogenesis, megagametogenesis, Embryogenesis.

TEŐEKKÜR

Tez konumu veren, alıőmalarım sırasında yakın ilgi ve ok değerli katkılarını esirgemeyen sayın Hocam Prof. Dr. Gönül ALGAN'a, ayrıca tez çalıőmalarım süresince yapıcı önerileriyle yardımcı olan Sayın Hocam A.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Başkanı Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	10
2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	10
2.2. Materyallerin alınması ve tespiti	11
2.3. Preparatların hazırlanması	13
3. GÖZLEMLER VE SONUÇLAR	15
3.1. Çiçeğin yapısı	15
3.2. Dişi organın yapısı ve gelişmesi	17
3.3. Tohum taslaklarının gelişmesi	17
3.4. Megasporogenez	17
3.5. Dişi gametofit dölün gelişmesi	21
3.6. Olgun embriyo kesesinin yapısı	23
3.7. Dişi gametofit dölde gözlenen gelişme bozuklukları	25
4. TARTIŞMA	29
5. KAYNAKLAR	33

1. GİRİŞ

Canlıların yaşamlarını sürdürebilmelerinin ilk koşulu beslenme olduğuna göre, gerek tarım gerekse hayvancılık dünya üzerinde önemsenecek konuların başında gelmektedir. Beslenmede ise, sağlıklı bir yaşam için dengeli beslenmenin şart olduğu tartışılmaz bir gerçektir. Gelişmiş ülkelerde bu konu hemen hemen çözümlenmiş durumdadır. Ülkemizde yapılan istatistikler, beslenmede tahıl tüketiminin çok fazla olduğunu hayvansal ürün tüketiminin ise, çok düşük düzeyde bulunduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, kırsal kesimde dengeli beslenmeden söz etmek imkansızdır. Beslenme bilgisinin yetersizliğinin dışında bunun doğal nedenlerinden biri de hayvan üretiminin azlığı, verimin düşüklüğü ve dolayısıyla hayvansal ürünlerin yetersizliğidir. Araştırmacılar ülkemizdeki hayvansal ürün azlığını yem kaynaklarının azlığına bağlamaktadırlar. Bu sorunun çözümü için, bütün gelişmiş ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de geniş alanlarda yem bitkisinin yetiştirilmesine ihtiyaç vardır. Hayvan yemi olarak kullanılan, ziraatı yapılabilecek çok az sayıda yem bitkisi mevcuttur. Bunlardan biri de, **Trifolium pratense L.** (Çayırüçgülü)'dir. Leguminosae familyasına dahil olan bu bitki çok yıllık bir bitkidir. Genel olarak serin ve nemli iklimlere uyan **Trifolium pratense L.** uzun gün bitkisidir. Boyu 1 metreye kadar uzayabilir. Ekimi sonbahar ve ilkbaharda yapılır. İlkbaharda başlayan çiçeklenme yaz sonuna kadar devam eder. Hemen tamamen kendine kısır olan bu bitki yabancı tozlanmadan sonra tohum verebilir. Ağustos ayında maximum çiçeklenme görülür.

Hayvan yemi olarak yılda 2 defa biçilebilir. Kuru otu oldukça besleyicidir. Özellikle, Ca yönünden yonca ve korungadan daha üstündür. Bu bitkinin hayvan yemi olmasının dışında, toprağı azot yönünden zenginleştirdiğı ve erozyonu önlediğı de literatürde kayıtlıdır.

Trifolium pratense L. Avrupa ülkeleri ve Amerika'da geniş alanlarda ziraatı yapılan bir bitkidir. Örneğin, Amerika'da yılda 32-40 milyon dönüm alanda ziraatı yapılmaktadır (Hughes. H.D. Heath. M. E ve Metcalfe D.S. 1967). Bu

nedenle uzun yıllar üzerinde durularak ıslah çalışmaları yapılmış çeşitli problemleri araştırmalara konu olmuştur.

1944'de Fedorchuk, Çayırüçgülü'nün tohum taslağı ve tohum gelişmesini incelemiştir. Kural olarak, her ovaryumda 2 tohum taslağının geliştiğini ancak bazen aynı ovaryumda 3, 4 hatta 5 tohum taslağına rastladığını belirtmiştir. Araştırmacı çok miktarda arkespor hücrelerinin meydana geldiğini, fakat, genellikle bunların büyük bir kısmının somatik şartlara geçtiğini, bir tohum taslağı içinde 1 ile 5 arasında ana hücrenin gözlendiğini beyan etmiştir. Her bir tetradın vertikal sıralar halinde görüldüğünü, genel olarak 1 fakat, sık sık 2 megaspor tetradına aynı tohum taslağı içinde rastladığını da söylemiş ileriki gelişmelerde 2 veya 3 kesenin geliştiğini belirtmiştir. Tetradlardan mikropil tarafındaki 3 hücrenin ortadan kalktığını, diğerinin keseyi meydana getirdiğini, normal 8 çekirdekli bir kesenin oluştuğunu ifade etmiştir. 5 mm. boyundaki bir çiçek tomurcuğunda embriyo kesesinin gelişmesini bitirdiğini, kalaza tarafındaki 3 antipod hücrelerinin çok erkenden yok olduğunu gözlemiştir. Ayrıca araştırmacı, keseye polen tüplerinin girdiğini gördüğü halde döllenmeyi gözleyemediğini de belirtmiştir. Polinasyonun 12. gününde embriyonun tamamen geliştiğini ve gelişmenin bütün safhalarında embriyonun mikropil bölümüne bağlı kaldığını rapor etmiştir. Araştırmacı normal, embriyo kesesiyle beraber aynı zamanda gelişen diğer bir embriyo kesesinin de kalaza tarafında görüldüğünü, makrospor ana hücrelerinin dışında bağımsız olarak gelişen bu kesenin, yumurta aygıtının kalaza tarafında bulunduğunu, ancak bu kesede herhangi bir embriyo gelişmesi gözleyemediğini belirtmiştir. Araştırmacı araştırmaları sırasında, tohum taslaklarında bazı anormal gelişmelerin gözlendiğini de belirtmiş ayrıca, embriyo gelişmesi esnasında da herhangi bir sebeple gelişmenin tamamen durabileceğini vurgulamıştır.

1963'de Hindmarsh, İngiltere'de yetişen diploid *Trifolium pratense* L.'de yaptığı çalışmada erkek ve dişi gametofit dölün gelişimini incelemiştir. Her bir ovaryumdaki iki tohum taslağında bulunan embriyo keselerinin nispeten aynı zamanda geliştiğini belirterek, bunlardan birinin veya her ikisinin birden sonra-

dan dejenere olabileceğini belirtmiştir. Çalışmaları sırasında somatik aposporiye de rastladığını ifade etmiş, herhangi bir döllenme ya da embriyo gelişmesi gözleyemediğini bildirmiştir. Araştırmacı olgun embriyo keselerinde bazen yumurtanın aşırı derecede vakuol ihtiva ettiğini, sinerjitlerin parçalandığını ve primer endosperm hücrelerinde anormallikler bulunduğunu belirtmiş ancak bunların kalıtsal bir anormallikten mi yoksa döllenme başarısızlığından mı ileri geldiğini açıklığa kavuşturamamıştır.

1970 yılında Mackiewicz Octoploid *Trifolium repens* L.'de az sayıda tohum teşekkül etmesinin sebeplerini araştırmak amacıyla, makrosporogenez, dişi gametofit döl gelişmesi, polen morfolojisi ve polen tübünün gelişmesini incelemiştir. Araştırmacı bitkide mayoz bölünmelerin normal olduğunu, ancak polenlerde bazı dejenerasyonların görüldüğünü bildirerek, octoploid formlarda tohum bağlama oranındaki azlığı, ovaryumdaki ovullerin ve tohum kabuğu içindeki tohumların gelişmeleri ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır.

1970'de Kazimierski ve Kazimierska, Leguminosae familyasından olan *Lupinus luteus* L.'nin haploid formlarında megasporogenez ve embriyo kesesi gelişmesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, mikrosporogenez ve megasporogenez gelişmesi sırasında ortaya çıkan düzensizliklerin *Lupinus luteus* L.'nin haploid formlarında steriliteye sebep olduğunu bildirmişlerdir. İnceledikleri haploid bitkilerde, polen ana hücresinde mayoz bölünmenin düzensiz olduğunu belirtmişler ve megasporogenez gelişiminin düzenli olduğunu ancak bundan sonraki gelişme kademelerinde sapmalar olduğunu bildirmişlerdir.

Yine aynı araştırmacılar (1975), *Lupinus luteus* L.'nin yabani formu ile kültür çeşiti arasındaki melez formunun sitogenetiksel özelliklerini inceleyerek, melezlemeler sonucu polen ve dişi gametofit dölün yaşama yeteneklerinin % 50 oranında azaldığını açıklamışlardır.

Kazimierska, *Trifolium* türlerinin melezlenmesi üzerine yaptığı çalışmada (1978a) *Trifolium pratense* L.'nin stıgması üzerinde 9 *Trifolium* türünün (T. al-

pestre, *T. angustifolium*, *T. arvense*, *T. desvauxii*, *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. lappaceum*, *T. medium* ve *T. repens*) polen çimlenmesini incelemiştir. Araştırmacı *T. pratense* poleninin *T. desvauxii* ve *T. hybridum*'un stigmaları üzerinde başarıyla çimlendiğini fakat polen tüplerinin stilus içinde gelişemediğini belirtmiştir. Yine *T. pratense* poleninin *T. medium*'un stıgması üzerinde zayıf bir çimlenme gösterdiğini ifade etmiştir. Kazımierska materyal olarak kullandığı bitkilerden *T. pratense*, *T. hybridum* ve *T. medium*'un olgun embriyo keselerinin yapılarında çalışmıştır. İncelenen 897'den fazla *T. Pratense* L. tohum taslağında *T. medium*, *T. arvense*, *T. incarnatum* ve *T. lappaceum* polenleri tarafından döllenerek ancak 4 tane *T. pratense* tohum taslağı bulunduğunu belirtmiştir. Araştırmacı hibritleşmenin olmadığı türlerde, bir ana bitkinin poleninin diğer ana bitkinin stıgması üzerinde zayıf çimlenmesinin ve döllenmenin çok seyrek olarak meydana gelmesinin sebeplerinin türler arasındaki genom homolojisi eksikliğinden olabileceği sonucuna varmıştır. Stilus uzunluğu ve polen farklılıklarının hibritleşmeye engel olamayacağını ifade etmiştir.

Yine aynı yıl (1978b) Kazımierska, *T. repens* L. ile *T. medium* L.'nin çaprazlamasından elde edilen melez bitkide döllenme, endosperm ve embriyo gelişmelerini incelemek amacıyla yaptığı çalışmasında döllenmeyi gözleyemediğini fakat melez embriyonun geliştiğini belirtmiştir. Araştırmacı polinasyondan sonra 4. ile 5. güne kadar gelişmenin düzenli fakat ebeveyn formlardaki embriyo ve endosperm gelişimlerinden daha yavaş olduğunu ifade etmiştir. Polinasyondan sonra 5. günde melez tohumların gelişme ve büyümelerinin engellendiğini, embriyo hücrelerinde vakuollerin arttığını, endosperm çekirdeklerinin kısmen dejenerasyon olduğunu ve melez embriyoların öldüğünü bildirmiştir.

1979'da Kazımierski ve Kazımierska, indirgenmiş yapraklı *Trifolium hybridum*'da embriyo kesesi yapısı, döllenme ve embriyo gelişmesini inceleyerek, bu türde dişi gametofit döldeki düşük fertilitenin nedenlerini araştırmışlardır.

Embriyolojik analizler sonucu bu bitkilerde megasporogenez ve megagametogenezdeki sapmaların, normal yapraklı bitkilere oranla daha sık görüldüğünü

belirterek embriyo ve endosperm gelişiminin normal olduğunu ancak normal yapraklı bitkilere göre daha yavaş geliştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu bitkilerde ölen embriyoların oranının daha yüksek olduğunu böylece, yaprak azalmasının embriyo gelişimi, döllenme ve dişi gametofitin gelişmelerini etkilediğini ifade etmişlerdir.

Yine aynı araştırmacılar, indirgenmiş ince-uzun yapraklı **Trifolium hybridum** üzerinde yaptıkları genetiksel çalışmalarla bu bitkide yeni bir mutantın tanımını vermişlerdir (1979). Mutantların ovaryumda dişi gametofitte gelişme eksikliğine sebep olduğunu belirtmişler ve genetik analizlerin morfolojik değişmeler gösterdiğini "reductivus" olarak adlandırılan genin resessif bir allelinin fertilitenin düşük olmasına sebep olduğunu açıklamışlardır.

1973'te Krupko, **Trifolium alexandrinum** L.'nin Palestine çeşitinde megasporogenez ve embriyo kesesi yapısı ve gelişmesinin **Trifolium pratense** L.'ye çok benzediğini söylemiştir. Araştırmacı bu bitkide embriyo kesesinin monosporik, 8 çekirdekli ve Polygonum tipinde olduğunu belirterek, embriyo kesesi gelişimi ile polenlerin olgunlaşmasının aynı zamanda olmadığını ifade etmiştir. Krupko, incelediği örneklerde 2 hücreli proembriyoya rastladığını ancak, proembriyonun daha ileri safhalarına ve endosperm çekirdeklerine rastlamadığını da açıklamıştır.

Harrison ve Harrison, **Trifolium pratense** L.'de polen-stigma ilişkileri üzerine bir seri araştırma yapmışlardır. 1982'de yaptıkları çalışmalarında, **T. pratense** L.'de stigma salgısı ve stilus sıvısını oluşturan bileşiklerin özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, bu bitkide stilus borusunun uzun olduğunu, polenlerin stigma tepesine geldiklerinde çimlenerek, polen tüplerinin sulu bir salgı içeren kanaldan orta kısma doğru ilerlediklerini ancak stigmanın şişkin kısmından geçtikten sonra kanalda, salgı hücrelerinin genişlemesi nedeniyle durdurulduklarını açıklamışlardır.

Yine aynı araştırmacılar, **T. pratense** L.'de stilus kanalının salgı sistemini ince-

lemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında (1982), stilus gelişiminin evrelerini, salgının oluştuğu ve salgılandığı hücrelerin ince yapılarını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bu bitkide stilus boyunca uzanan ve lisigen olarak meydana gelen bir kanalın bulunduğunu açıklamışlardır. Kanalın stilusun olgunlaşması süresince kendi hücreleri ve komşu çeper hücreleri tarafından salgılanan bir salgı ihtiva ettiğini ve bu salgının iç çeperler arasındaki boşluklarda biriktiğini ifade etmişlerdir.

Harrison ve Harrison'un *T. pratense L.*'nin stigma ve stilusu üzerinde yaptıkları çalışmalardan biri de, bu bitki de stigma organizasyonunun ince yapısı ile ilgilidir (1983). Çalışmalarında bu bitkide stigmanın papillalarla çevrili bir yüzeye sahip olduğunu belirten araştırmacılar, salgı hücrelerinin uzamış olduğunu, bu hücrelerin salgı ürünü ile interselüler alanları doldurduklarını açıklamışlardır. Salgının esteraz aktivitesi ile protein ve karbonhidratları sito-kimyasal olarak etkiliyen yapışkan, sulu bir görünüşü olan lipidçe zengin bir emülsiyondan oluştuğunun açıklamışlardır.

1987'de Sawai ve Ueda *Trifolium medium L.* x4x *Trifolium pratense L.*'nin melez embriyo gelişmesini incelemişler ve melez embriyonun tozlaşmadan sonra 8. günde globular safhaya, 12. günde kalp-şekilli safhaya ulaştığını, embriyonun 15. günde parçalandığını ya da vakuollü bir yapı gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, melez endospermin nuklear safhada kaldığını ve 15. günde parçalanıp dağıldığını gözlemişlerdir. Yaşayabilecek durumda olan ovuller ile ovaryumların meydana gelme sıklıklarının 12. günde % 38 iken 18. günde % 5'e düştüğünü gözlemişlerdir.

Dünyanın bir çok ülkesinde bu bitkinin ıslahı, yetiştirilmesi ve *Trifolium pratense L.*'den daha fazla yararlanma imkanlarının araştırılması için bilim adamları birçok genetiksel çalışmalar da yapmakta, daha üstün soyların geliştirilmesi için uğraşmaktadırlar.

1987'de Taylor ve Wiseman *Trifolium pratense L.*'nin çaprazlanmış 4x-2x

kültürleri üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar, beyaz çiçekli ve yaprakları leke-
li olmayan tetraploid klonlar ile kırmızı çiçekli "Kenstar" bitkilerini arıların da
katkısı ile çaprazlamışlar ve üretilen 169 bitkiden 119 tanesinin ana bitki, 36 ta-
nesinin melez olduğunu ve 14'ünün de öldüğünü belirtmişlerdir. 36 melez bitki-
den 33'ünün triploid ($3x = 21$ veya 22) 2'sinin tetraploid ($4x = 28$ veya 30) ve 1 ta-
nesininde pentaploid olduğunu tespit etmişlerdir. Diploid ve tetraploid ana bit-
kilerdeki, boyanabilen polenlerin oranının %80-96 triploidlerde bu oranın %
71, olduğunu ifade etmişlerdir. araştırmacılar genetiksel analizler sonucunda, **T.**
pratense L.'nin kromozomları üzerindeki genlerin bazı bilinmeyen bölgelerini
tespit etmişlerdir. Triploidler ile çaprazlamada verimli tohumlar elde edilebile-
ceğini belirten araştırmacılar, aynı zamanda triploidlerin yüksek ploidylerin gene-
rasyonlarında faydalı olabileceklerini açıklamışlardır.

Zirai bakımdan önemli türlerin gen haritalarının çıkarılmasında trisomikle-
ri kullanmak amacıyla çalışmalar yapan Taylor ve Chen (1988), diploid-triploid
ve tetraploid **T. pratense L.**'nin çaprazlanması sonucu oluşan trisomikleri izole
etmeyi başarmışlardır.

Son yıllarda Ülkemizde de **T. pratense L.** ile ilgili bazı çalışmalar yapılma-
ya başlanmıştır. Bu bitkilerde tozlaşmanın böcek faaliyetlerine bağlı olduğunu,
tohum teşekkül oranının düşük olmasının tozlaşma zorluğundan olabileceğini
düşünen Özbek 1980'de Doğu Anadolu Bölgesinde Çayırüçgülü (**Trifolium pra-**
tense L.) 'nü tozlayan arılar (**Hymenoptera: Apoidea**) üzerine yaptığı araştırma-
sında, bu bölgede çayırüçgülü'nü değişik familyalara ait 83 kadar arı türünün zi-
yaret ettiğini saptamıştır. Bunlar içerisinde en yüksek popülasyonu toplam arıla-
rın % 70'ini oluşturan **Bombus** cinsinin meydana getirdiğini belirtmiştir. Araştı-
rmacı **Bombus** cinsine bağlı türlerde glossanın çiçek boğazının dip kısmına yetişe-
cek kadar uzun olması nedeniyle nektar alırken, tozlaşmaya yardımcı oldukları-
nı, diğer taraftan bu türlerin iri yapılı olması sebebiyle kayıkçık ve kanatçığı ko-
layca açabildiklerini ve çiçek tozlarını alabildiklerini ifade etmiştir. Özbek,
Bombus türlerinin tozlaşmada olumlu etki yapan yönlerinden birinin de, dakika-

da ziyaret ettikleri çiçek sayısının diğer arı türlerinin birçoklarına oranla daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Arıların ziyaretine serbest bırakılmış olan parsellerde bir kömeçteki tohum sayısının % 78 olmasına karşın, arılardan tecrit edilmiş parsellerde % 0.2 olarak saptamıştır. Tozlaşmanın hemen hemen tamamen arı faaliyetine bağlı olduğunu iddia eden araştırmacı, çayırüçgülü'nde tohum verimini yüksek düzeye çıkarabilmek için, diğer zirai ihtiyaçlara ilave olarak, tozlayıcı arılardan da iyi bir şekilde yararlanma imkanlarını araştırmak gerektiğini vurgulamıştır.

1988'de Gök, doğal tetraploid Elçi Çayırüçgülü seçme klonlarında melezlenme ve tohum tutma farklılıklarını belirlemek ve çeşitler arasından en üstün özelliklere sahip bitkinin bulunarak tarımımıza kazandırılması amacıyla çalışmalar yapmıştır. Klonlar arasında el ile yapılan tozlamalar ile suni tozlama sonucunda, bu klonların birbiri ile tozlanıp döllenme affinitelerini belirlemiştir. Araştırmacı çiçek tozlarını çimlendirerek klonlardaki çiçek tozlarının çimlenme oranlarını tespit etmiştir. Araştırmada kullandığı bütün materyallerde çiçek tozlarının % 99-100 arasında boyanma gösterdiklerini, E2 çeşidinde çimlenen çiçek tozu oranının %60, boyanan çiçek tozu oranının % 100 olduğunu tespit etmiştir. Tetraploid Çayırüçgülü materyalinde bulunan çiçek tozu porlarının, genellikle diploidden daha fazla olduğunu, özellikle E2 çeşitinin çiçek tozları ile diploid çeşitin çiçek tozları arasında belirgin bir farklılık bulunduğunu bildirmiştir. Tohum tutma oranı % 2.2 olan E2 çeşidini esas alarak, her çeşidin 4 kömeğinde 25'er çiçek üzerinde yaptığı resiprokal melezlemeler sonucunda, en düşük tohum veriminin E2 çeşidinin ana bitki olarak gözüktüğü E2 x E1-9 melezlemesinde ortaya çıktığını ve bu melezlemeden hiç tohum elde edilemediğini bildirmiştir. Gök bunun nedenini tam olarak ortaya koyabilecek bir araştırmaya rastlamadığını da belirtmiştir.

Bizde bunu esas alarak, erkek gametofit dölün gelişmesinde herhangi bir aksaklık bulunmayan ve tohum bağlama oranı % 2.2 olan doğal tetraploid Elçi Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.) E2 çeşidinde, tohum bağlama probleminin

diŖi gametofitin geliŖmesinden veya yumurta hücresinin teŖekkülünden kaynaklanabileceğini düşünerek, bu konuya açıklık getirmeyi amaçladık.



2. MATERYAL VE METOT

Araştırma materyali olan doğal tetraploid Elçi Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.) tohumları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edildi. Deneme için, 1982'de Elçi tarafından Doğu Anadolu'da yapılan bitki toplama gezilerinde Erzurum (Tortum) çevresinde bulunan, vejetatif organlarının gelişmesi çok üstün görülen (Şekil 2.1) ve yem bitkisi olarak yetiştirilmesinin uygun olacağı belirtilen (Elçi 1982) doğal tetraploid Elçi Çayırüçgülü seçme klonlarından tohum bağlama oranı % 2.2 olan E2 çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'nin habitusu.

2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi.

Denemeler tarla ve sera şartlarında yürütülmüştür. Araştırmada kullanılacak bitkilerin yetiştirilmesi için tohumların bir kısmı 1/1/1 oranında elenmiş bahçe toprağı, yanmış elenmiş ahır gübresi ve kum karışımından oluşan harçla

doldurulmuş 23 cm. çapında ve 23 cm. derinliğindeki toprak saksılara serpmeye usulü ekilmiştir. Bir miktar tohumda 25-30 °C'lik etüvde çimlendirildikten sonra, kök uçlarına zarar vermeden saksılara dikilmiştir. Daha sonra saksılar sulanarak sera da gelişmeye bırakılmışlardır. Diğer yandan, tohumların ekimi için fakülte bahçesinde bu amaca yönelik bir alan ayrılmıştır. Şubat ayı başında tarla sürülmüş, tohumlar mart ayı sonuna doğru, seyrek dağılımı sağlamak amacıyla serpmeye şeklinde ekilmiş ve üzerleri 3 cm. kahlık olacak şekilde örtülmüştür. Hava sıcaklığına ve su kaybına dikkat edilerek, bitkiler günde bir defa veya gün aşırı sulanmıştır.

2.2. Materyallerin alınması ve tespiti

Materyal alma işlemine *Trifolium pratense* L. tomurcuklanma devresine girdiğinde başlanmış ve çiçeklenmenin sonuna kadar devam edilmiştir. Dişi organın embriyolojik gelişmelerini, megasporogenez ve megagametogenezini inceleyebilmek amacıyla tomurcuğun en küçük safhasından itibaren 5 farklı safha:

T₁..... tomurcuk başlangıcı, kömeç boyu ortalaması 3.54 mm.

T₂..... tomurcuk, kömeç boyu ortalaması 11.52 mm.

T₃..... tomurcuğun yarısında çiçeklenme başladığında, kömeç boyu ortalaması 16.76 mm.

T₄..... Çiçek, kömeç boyu ortalaması 22.76 mm.

T₅..... solmuş çiçek, kömeç boyu ortalaması 21.64 mm. tespit edilmiştir. Bu çeşit bir planın uygulanmasından amacımız dişi organ gelişmesini çeşitli gelişme safhalarında gösterdiği değişimleri tespit ederek, makrospor ana hücrelerinden itibaren embriyo kesesi gelişmesini ve yumurta hücrelerinin teşekkül edip etmediğini araştırmaktır. Bahçe ve seradan alınan örnekler en kısa zamanda laboratuvara getirilerek, kömeç boyu uzunluğu ölçülmüş, kömeçteki çiçekler ayrıla-

Çizelge 2.2.1 Örnek olarak alınan değişik evrelerdeki kömeçlerin ortalama boyları ile kömeçteki çiçek sayıları ve çiçek boylarının ortalaması.

Grup	Kömeç boyu ortalaması (mm)		Kömeçteki tek çiçek boyunun ortalaması (mm)			Kömeçteki ortalama çiçek sayısı			
	\bar{X}	Standart sapma	Standart hata	\bar{X}	Standart sapma	Standart hata	\bar{X}	Standart sapma	Standart hata
T ₁	3.54	4.53	0.91	0.42	0.19	0.03	52.8	12.8	2.6
T ₂	11.52	2.18	0.44	0.53	0.13	0.02	66.6	21.9	4.4
T ₃	16.76	2.89	0.58	10.33	6.42	1.28	69.3	13.0	2.6
T ₄	22.76	4.84	0.97	14.13	4.04	0.81	80.6	22.5	4.5
T ₅	21.64	6.64	1.33	15.62	6.73	1.35	79.4	18.7	3.7

\bar{X} : Ortalama

rak teker teker sayılmış ve 1 kömeçteki çiçek sayısı bulunarak çiçeklerin boyları ölçülmüştür. Ölçümler tomurcuğun en küçük safhasından itibaren 5 farklı boya tespit edilen 25 tane çiçek kömeçinin her biri için ayrı ayrı yapılmış ve ortalamaları alınarak Çizelge 2.2.1'de gösterilmiştir.

Daha sonra dişi organlar binoküler-mikroskop altında pens ve iğne yardımıyla örtü yapraklarından dikkatli bir şekilde ayrıldıktan sonra, stilus boyları ölçülmüş, ovaryum boyları ise, mikroskopta oküler mikrometre yardımıyla ölçülerek, ortalamaları alınmıştır.

Dişi organlar, Carnoy tespit çözeltisi (1 kısım asetik asit + 3 kısım % 95'lik etil alkol)'nde vakuma maruz bırakılarak havası alınmış ve bir gece bu çözelti içinde bekletilerek tespit edilmişlerdir.

2.3. Preparatların hazırlanması

Tespit işleminden sonra materyaller % 70'lik etil alkol ile asetik asit kokusu kalmayınca kadar yıkanmış ve % 70'lik etil alkol içinde korumaya alınmıştır. Daha sonra materyaller alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyona tabi tutulmuş ve ksilol içinde parafine doyurma işleminden sonra parafine gömülmüştür.

Her ovaryumda farklı yönde gelişen 2 tohum taslağının bulunması sebebiyle, doğru kesit yönünü tespit edebilmek amacıyla başlangıçta ovaryumlar parafin kalıplara değişik açılarda yerleştirilmiş ve bir süre bu kalıplarla kesitler alınarak, mikroskop altında incelendikten sonra doğru kesit yönü tespit edilebilmiştir. Bundan sonra dişi organlar parafin kalıplara 45 °'lik bir eğim olacak şekilde yerleştirilerek, kesitler 10-12 µ kalınlıkta, özellikle embriyo kesesi gelişme safhalarındaki çekirdek sayılarının doğru bir şekilde tesbit edilebilmesi için hiç bir kesit kaybına yer vermeksizin seri halde alınmıştır. Kesitler ferri amonyum sülfatın % 3'lük ($Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2 \cdot SO_4 \cdot 2H_2O$) çözeltisinde 30 dk. mordanlanarak, Heindenhain Fe'li hematoxylin boyasında 10 dk. bekletilerek boyanmıştır.

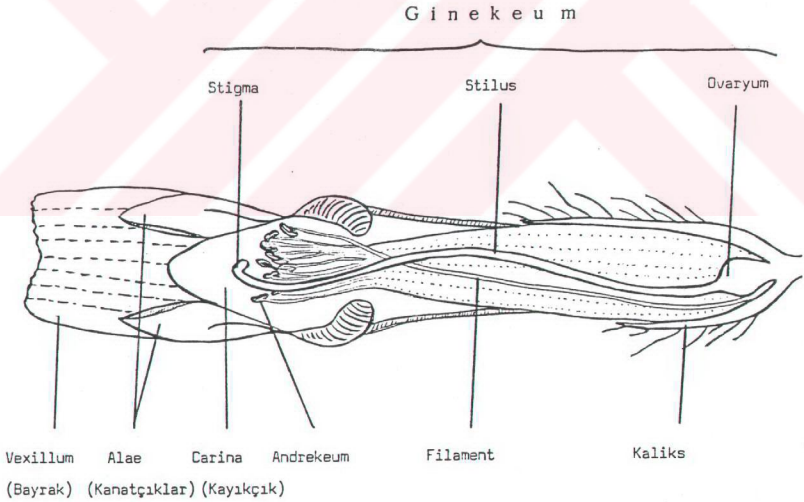
Saf etil alkol ile boyanın % 10'luk çözeltisi hazırlanmış ve sonra su ile % 0.5 oranında sulandırılmıştır (Johansen 1940). Daha sonra kesitler kanada balzamu ile kapatılmıştır.



3. GÖZLEMLER VE SONUÇLAR

3.1. Çiçeğin yapısı

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'nin çiçekleri kömeç durumundadır. Bu kömeç çok fazla sayıda (50-130) çiçekten meydana gelir (Şekil 3.1.2). Çiçekler tabandan uça kadar yükselen bir düzende gelişir ve açarlar. Kaliks 5 adet bileşik sepalli ve tüylüdür. Korollo tabanda uzun-dar kapalı bir boru teşkil eder ve farklı şekillerde gelişmiş 5 petalden oluşur. Bunlardan bütün çiçeği saran üstteki taç yaprağa vexillum, yanlardaki birbirine benzer bir çift taç yaprağa Alae ve kanatçıklar tarafından sarılmış olan bir çift yaprağa da, Carina adı verilir. Andrekeum 10 stameni, filamentlerin 9'u tabanda birleşik ve 1 tanesi serbesttir. Ginekeum üst durumlu, stilusu uzundur. Stigma ise anterlerin üzerine uzanır (Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1. *Trifolium pratense* L. çiçeğinin boyuna kesiti



Şekil 3.1.2. *Trifolium pratense* L.'nin çiçeği

3.2. Dişi organın yapısı ve gelişmesi

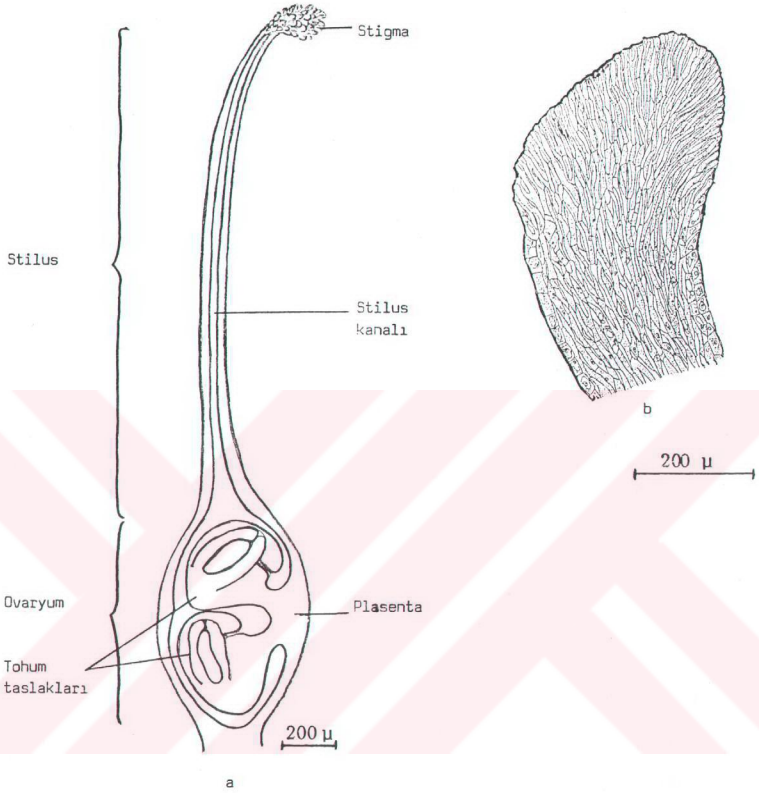
Trifolium pratense L.'de tek karpelden meydana gelmiş ve tek bölmeli ovaryumlar, ortak parietal bir plasentadan çıkan 2 adet kampilotrop tohum taslağı ihtiva ederler (Şekil 3.2.1.a). Stilus, çiçeğin gelişmesi süresince büyük ölçüde uzamıştır. Kömeç boyu ortalaması 3.54 mm. olarak tespit edilen T_1 örneklerinde stilus uzunluğu ortalaması 0.1 mm iken kömeç boyu ortalaması 21.64 mm olan T_5 örneklerinde stilus uzunluğu ortalaması 1.4 cm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2.2). Stilus, kendi uzunluğu boyunca devam eden düz ve geniş bir kanal ihtiva eder. Kanal ovaryum boşluğu ile stigma tepesinin alt kısmı arasında devamlıdır (Şekil 3.2.1a). Dişi organın stıgması birbirine bağlı pek çok papilla ile kaplıdır (Şekil 3.2.1b). Bu papillaları ince bir kutikula tabakası çevirmektedir.

3.3. Tohum taslaklarının gelişmesi

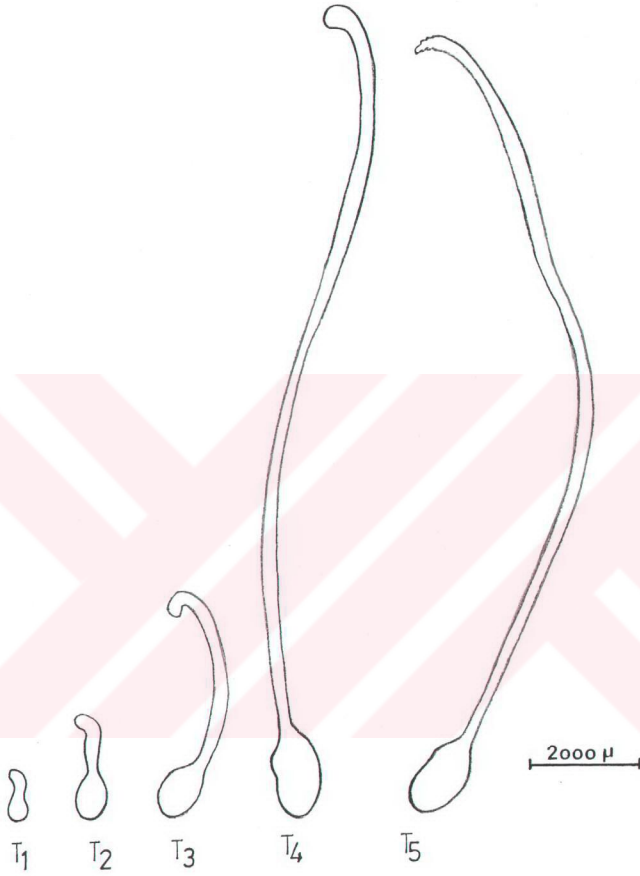
Kömeç boyu ortalaması 3.54 mm. (T_1) olan tomurcuklardaki ovaryumlardan alınan kesitlerde, iki integüment primordiumunun tabandan çıkarak farklılaştığı ve daha ileri evrelerde integümentlerin gelişmesi sonucu ovaryumun kampilotrop ovaryum şeklinde farklılaştığı görülmüştür (Şekil 3.3.1). Olgun embriyo kesesi teşekkül etmiş örneklerde, iç integüment iki hücre kalınlığındadır ve tamamen nusellusu örter. Dış integüment çok kalındır ve bunlardan biri daha çabuk gelişerek, iç integümentlerin birleşme yerini örterek diğer dış integümentle birleşir. Böylece zig-zag yapılı mikropil meydana gelmiş olur. Tohum taslaklarının bükülmesiyle mikropil funikulusa yaklaşmıştır.

3.4. Megasporogenez

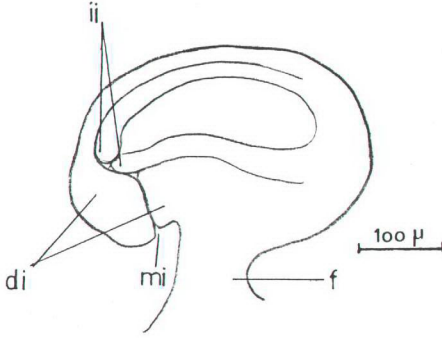
İntegüment primordiumlarının farklılaşmasıyla, nusellus bölgesindeki hücrelerden bir kısmı ön tarafa doğru bir çıkıntı meydana getirir. Buradaki hipodermal bir hücrenin farklılaşmasıyla diğer hücrelerden oldukça büyük bir hücre teşekkül eder. Bu hücre daha sonra megaspor ana hücrelerini meydana getirir



Şekil 3.2.1. a) *Trifolium pratense* L.'nin dişi organının boyuna kesiti.
b) Dişi organın stıgması.



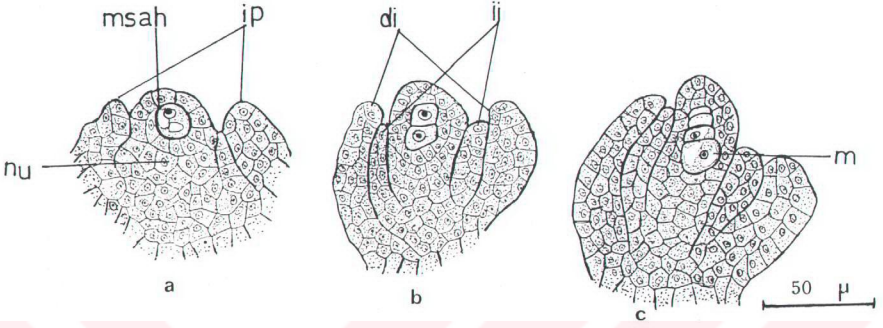
Şekil 3.2.2. *Trifolium pratense* L.'nin dişi organının farklı gelişme evreleri



Şekil 3.3.1. *Trifolium pratense* L.'nin kampilotrop tohum taslağı

- ii: iç integümentler
 di: dış integümentler
 mi: mikropil
 f : funikulus

(Şekil 3.4.1a). Kömeç boyu ortalaması 3.54 mm. olan T_1 örneklerinde gördüğümüz bu megaspor ana hücresinden önce 2 megaspor teşekkül eder (Şekil 3.4.1b). Nusellusun üst kısmına yakın bir yerde, diğer nusellus hücrelerinden daha büyük olan bu 2 hücrenin çekirdekleri, diğer hücelere oranla daha iri ve sitoplazmaları da daha koyu boyanmıştır. Daha sonra 4 megaspor oluşur (Şekil 3.4.1c). Bu 4 megaspor da linear bir tarzda düzenlenmiş tetradı meydana getirirler. Mikropil tarafında yer alan 3 megasporun alta kalaza tarafında bulunan megaspora oranla boyutları daha küçüktür. Mikropil tarafındaki bu 3 megaspor dejenere olurken, kalaza tarafındaki megasporun boyutlarında artış olur. Megaspor tetrad safhasında iken, iç integümentler hemen hemen eşit boydadırlar.



Şekil 3.4.1. *Trifolium pratense* L.'de megasporogenez ve integümentlerin gelişimi.

a) megaspor ana hücresi b) 2 hücreli evre c) tetrad

ip: integüment primordiumları

nu: nusellus

m: megaspor

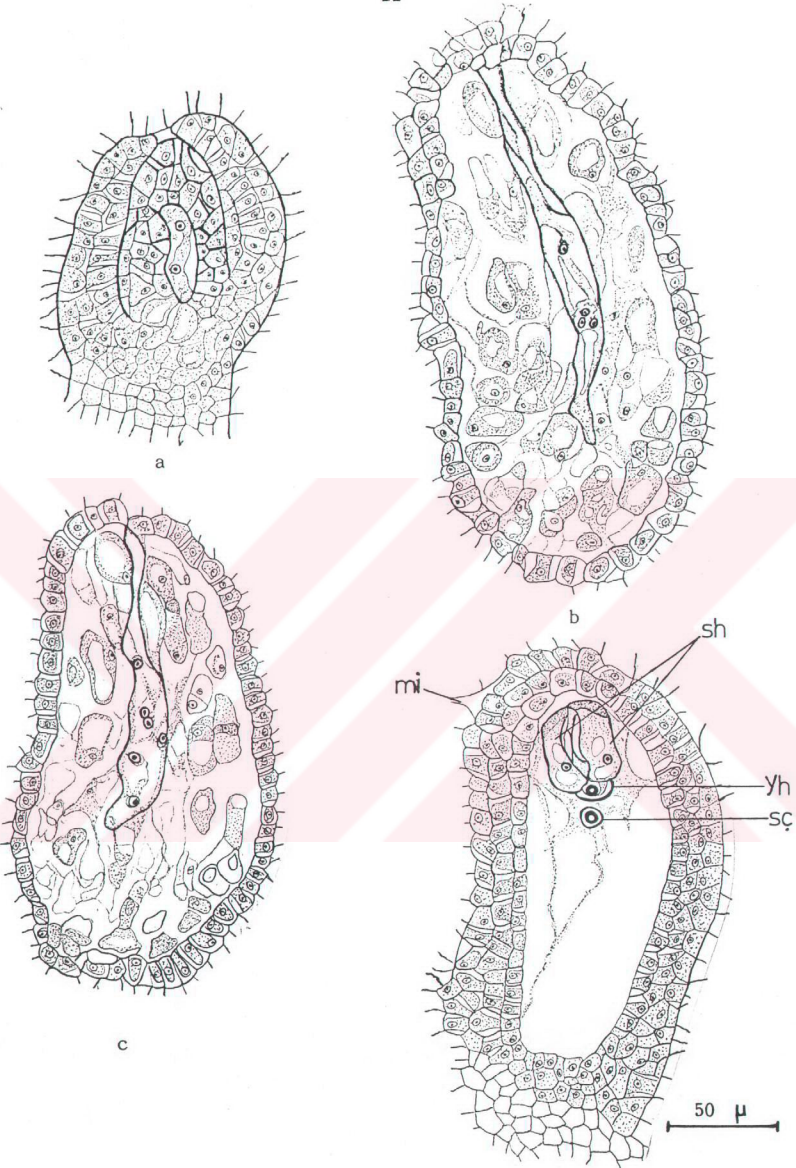
msah: megaspor ana hücresi

ii: iç integümentler

di: dış integümentler

3.5. Dişi gametofit dölün gelişmesi

Farklı boylarda tespit edilen dişi organlardan, kesit alınan ovaryum sayılarının toplamı 448'dir. Her ovaryumda 2 tohum taslağı olduğunu düşünürsek, incelenen toplam tohum taslağı ise, 896 civarındadır. Farklı boyutlardaki dişi organlarda, dişi gametofit dölün değişik gelişme aşamaları saptanmış ve mikroskop-tan şekilleri çizilmiştir. Kömeç boyu ortalaması 11.52 mm. olan T_2 örneklerinden alınan tomurcuklardaki ovaryum kesitlerinde 2 çekirdekli embriyo kesesi görülmüştür (Şekil 3.5.1a). 2 çekirdekli embriyo kesesinde iki yanlarda uzunca birer vakuolün geliştiği ve mikropil tarafında 2-3 hücre sırasının bulunduğu gö-



Şekil 3.5.1. *Trifolium pratense* L.'de megagametogenez d
 a) 2 çekirdekli embriyo kesesi b) 4 çekirdekli embriyo kesesi
 c) 6 çekirdekli embriyo kesesi d) olgun embriyo kesesi

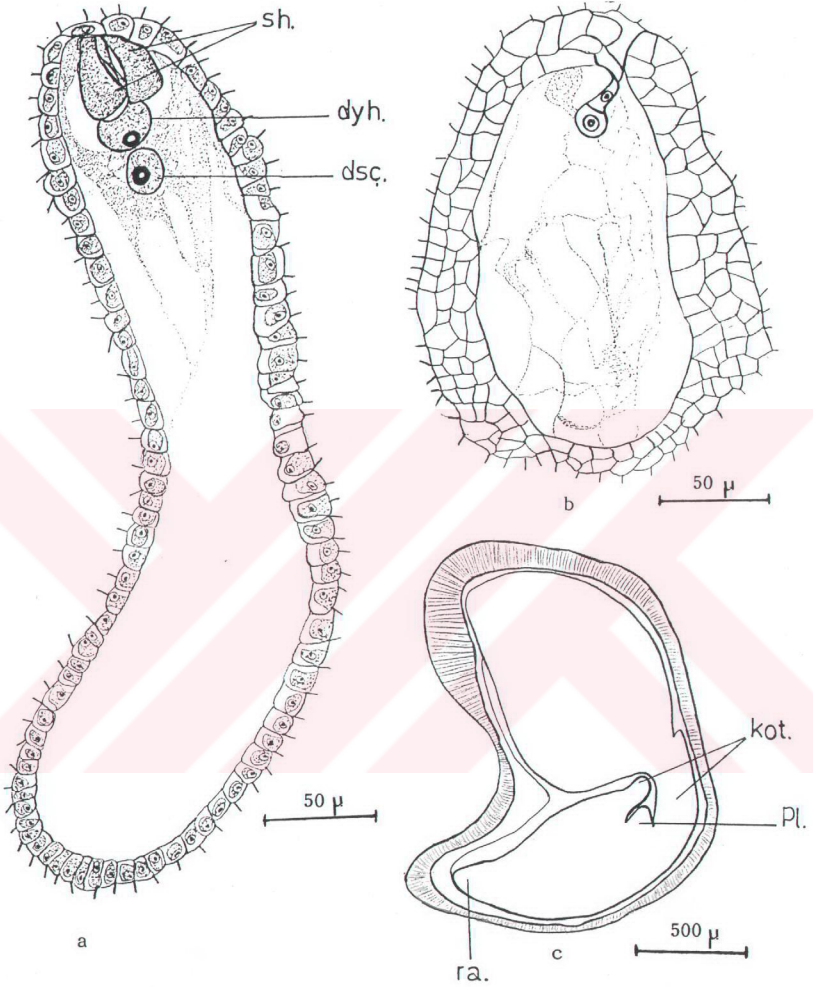
sh: sinerjit hücreleri
 yh: yumurta hücresi

mi: mikropil
 sc: sekonder çekirdek

rülmüştür. Kalaza tarafında ise, irili-ufaklı ve vakuollü nusellus hücreleri bulunmaktadır. Yine kömeç boyu ortalaması 11.52 mm olan T_2 örneklerinden alınan kesitlerde 4 ve 6 çekirdekli embriyo keseleri görülmüştür. 4 çekirdekli embriyo kesesinde (Şekil 3.5.1b) 3 çekirdek hemen hemen merkezde diğer çekirdek ise, bu 3 çekirdekten uzun bir vakuol ile ayrılmış durumda mikropil tarafına yakın yer almaktadır. Bu safhada embriyo kesesi çok sayıda çekirdekli ve büyük vakuollü nusellus hücreleri ile sarılmıştır. 6 çekirdekli embriyo kesesinde (Şekil 3.5.1c) ise, çekirdeklerin linear bir tarzda düzenlendikleri ve merkezde de 2 çekirdeğin yanyana buldukları görülmüştür. Diğer çekirdekler ise birbirlerinden birer vakuol ile ayrılmış durumdadırlar. Embriyo kesesi yine bir önceki 4 çekirdekli safhadaki gibi büyük vakuollü nusellus hücreleri ile sarılmış durumdadır. Kömeç boyu ortalaması 16.76 mm. olan T_3 örneklerinden alınan kesitlerde ilk defa olgun embriyo kesesinin meydana geldiği görülmüştür. Bu tomurcuklardan alınan toplam 77 adet ovaryumda incelenen 154 tohum taslağının yalnızca 5 tanesinde olgun kese teşekkülüne rastlanmıştır. Kömeç boyu ortalaması 22.76 mm. olan T_4 örneklerinden toplam 139 adet ovaryumda incelenen 278 tohum taslağının ise sadece 12 tanesinde olgun embriyo kesesinin teşekkül ettiği tespit edilmiştir. Buna göre T_3 ve T_4 örneklerinin her ikisinde de incelenen toplam 432 tohum taslağında olgun embriyo kesesinin teşekkül etme oranı yaklaşık % 4'dür.

3.6. Olgun embriyo kesesinin yapısı

Olgun embriyo kesesinde (Şekil 3.5.1d) mikropilar uçta bir yumurta hücresi ve 2 sinerjit hücresinden meydana gelen yumurta aygıtı yer alır. Sinerjit hücrelerinin geniş taban kısımları kısmen yumurta hücresini örter ve çekirdekleri alt kısma yakın yer alır. Sinerjit hücrelerinin çekirdeklerinin alt ve üst kısımlarında küçük birer vakuol gelişmiştir. Yumurta hücresinin mikropilar kısmında da büyükçe bir vakuol bulunmaktadır. Olgun embriyo kesesindeki sekonder çekirdek yumurta hücresine yakın yer almaktadır. Kömeç boyu ortalaması 16.76 mm



Şekil 3.6.1. *Trifolium pratense* L.'de döllenmeden sonra rastlanan bazı evreler.

- a) Döllenmiş yumurta hücresi ve sekonder çekirdek
b) 2 hücreli proembriyo c) olgun embriyo

dyh: döllenmiş yumurta hücresi
dsc: döllenmiş sekonder çekirdek
pl : plumula

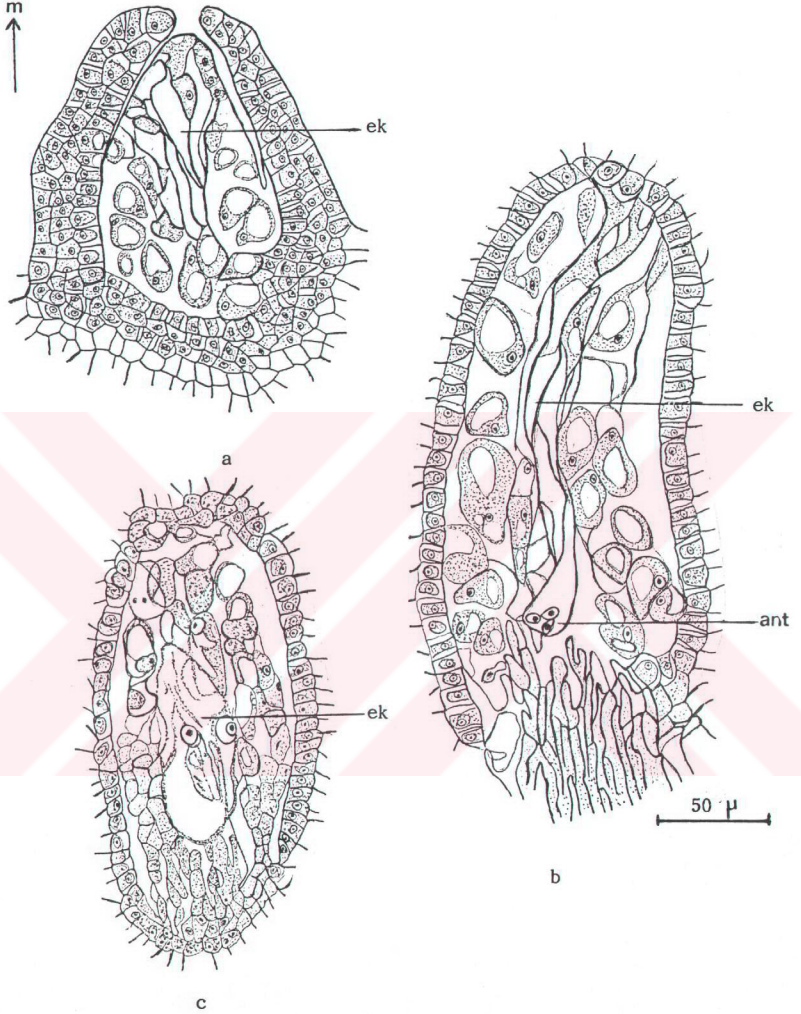
sh: sinerjit hücreleri
kot: kotiledonlar
ra: radikula

olan T_3 örneklerinden alınan kesitlerde, dejenere olduğu tespit edilen embriyo keselerinin birinde, boyutları küçük olan 3 adet antipod hücresine rastlanmıştır (Şekil 3.7.1b). Kömeç boyu ortalaması 22.76 mm olan T_4 örneklerinde ovaryumlardan alınan kesitlerin birkaç tanesinde döllenmiş yumurta hücresi ve sekunder çekirdeğe rastlanmıştır (Şekil 3.6.1a). Yine aynı boydaki çiçeklerin ovaryumlarından alınan kesitlerde, 2 hücreli proembriyo görülmüştür (Şekil 3.6.1b). Proembriyo, embriyo kesesinin mikropil tarafında asılı durumdadır. Kömeç boyu ortalaması 21.64 mm olan solmuş çiçeklerdeki 58 adet ovaryumdan alınan kesitlerde ise, sadece bir ovaryumda olgun embriyonun teşekkül ettiğini saptadık (Şekil 3.6.1c). Örneklerimizde 2 hücreli proembriyonun daha ileri safhalarını ve endosperm çekirdeklerini göremedik.

3.7. Dişi gametofit dölde görülen gelişme bozuklukları

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'de dişi organ gelişmesinin farklı gelişme evrelerinden aldığımız örneklerde, makrospor ana hücresinden itibaren dişi gametofit dölün çeşitli gelişme safhaları incelenirken, bu safhaların bir çoğunda gelişme bozuklukları ve dejenerasyon kademeleri tespit edilmiştir. Ovaryum içinde bulunan tohum taslakları aynı anda gelişme gösterdi. Normal gelişmiş olgun kesenin görüldüğü veya görülmesi gerektiği T_4 örneklerinin bazılarında aynı ovaryumda tohum taslağının birinde, olgun kese normal gelişirken, aynı anda diğerinde dejenere olmuş embriyo kesesi görüldü. Örneklerin pek çoğunda aynı anda iki kesede birden dejenerasyon çoğunlukla tespit edilen durum oldu. Bu bitkilerde dişi gametofit döl gelişmenin herhangi bir safhasında dejenerasyon belirtileri gösterebilmektedir. Bu anormal görüntüler çekirdeklerde küçülme-büzülme, kese içinde az sayıda çekirdek ve vakuolizasyonun artışı, kesenin büzülmesi olarak belirlenmiştir. Örneklerin bir kısmında da her bir tohum taslağı içinde orijini farklı olan iki ayrı embriyo kesesi gelişmesi gözlenmiştir. Bunlardan biri mikropil tarafında makrospor ana hücresinden gelişen sporogenez ve gametogenez safhalarında düzenli bir gelişme gösteren embriyo kesesi-

dir. Diğeri ise, kalaza tarafına yakın bir bölgedeki nusellus hücrelerinden birinin büyüyerek, makrospor gibi davranıp çekirdek bölünmesine başlamasıyla meydana gelen embriyo kesesidir. Her iki durumda keseler, vakuolizasyonları artmış genellikle çekirdekleri kaybolmuş büyük nusellus hücreleri ile çevrilmiştir. Mikropil tarafında makrospor hücresinden gelişen kesenin genel olarak büyüyen boyutlara ulaştıktan sonra dejenere olduğu görüldüğü halde, nusellus hücrelerinden gelişmekte olan kesede gelişmenin başlangıç safhalarında dejenerasyona daha sık rastlanmıştır. Bu kesenin normal kese boyutlarına eriştiği görülmedi. Yine bu bölgede bu şekilde gelişmiş olgun bir keseye hiç rastlanmadı. Erken fazda dejenere olmuş mikropilar keselerde bir veya iki çekirdek görüldü. Bunlarda kesenin boyutu küçüktür (Şekil 3.7.1a). Daha ileriki fazlarda kese boyutu epeyce artmış olmasına rağmen kesede büzülmeler görülmektedir. Bu büzülmeler bazen kesenin tümünde (Şekil 3.7.1b) bazen de, yalnız bir bölümünde olabilmektedir. Şekil 3.7.2a'da kesenin kalaza tarafı büzülmüş, mikropil tarafında ise körelmiş iki çekirdek görülmektedir. Kalaza tarafında nusellus hücrelerinden gelişen embriyo keselerinde ender olarak çekirdekli durum görülebilmektedir (Şekil 3.7.1c). Bazı örneklerde de, çekirdek ihtiva etmeyen irice bir hücrenin dejenerasyonu gözlenmiştir (Şekil 3.7.2b). Kalazal keselerde görülen en yaygın dejenerasyon kesenin erken fazda büzülmesiyle oluşan dejenerasyondur. Dejenere olmuş keselerde göze çarpan bir görüntü de, kalaza tarafından uzayıp yükselen bir grup hücrenin keseye doğru yaklaşmasıdır.



Şekil 3.7.1. *Trifolium pratense* L.'de dişi gametofit dölde tespit edilen farklı dejenerasyon kademeleri.

- a) erken evrede dejenere olmuş mikropilar kese
- b) büzülmüş embriyo kesesi
- c) Kalaza tarafındaki kesede görülen çekirdekler

ek: embriyo kesesi

ant: antipodlar

m: mikropil yönü



Şekil 3.7.2. *Trifolium pratense* L.'de dişi gametofit dölde tespit edilen ileri dejenerasyon kademeleri.
 a) kalaza tarafı büzülmüş olan embriyo kesesi
 b) kalaza tarafında bulunan büyük bir hücrenin dejenerasyonu
 m: mikropil yönü

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'de dişi organ gelişmesinin farklı gelişme safhalarından aldığımız örneklerin bir kısmında olgun embriyo kesesinin teşekkül ettiğini, büyük bir kısmında ise dişi gametofit dölde gelişmenin herhangi bir safhasında gelişme bozuklukları ve dejenerasyonların meydana geldiğini gözledik.

Örneklerimizde, bir ovaryumda yalnızca 2 tohum taslağının geliştiği gözlenmiştir. Halbuki *Trifolium pratense* L.'de tohum taslağı ve tohum gelişmesini inceleyen Fedorchuk (1944) aynı ovaryumda 3,4 hatta 5 tohum taslağına rastlamıştır. Aynı şekilde Hindmarsh (1963)'da ovaryumda bazen 3 tohum taslağının bulunduğunu belirtmiştir. Bu bitkide stilus dişi organın gelişmesi süresince büyük ölçüde uzamıştır. Buna göre, T₁ örneklerinde stilus boyu ortalaması 0.1 mm olarak ölçüldüğü halde T₅ örneklerinde 1.4 cm olarak tespit edilmiştir. Nitekim Hindmarsh (1963)'da stilusun embriyo kesesinin gelişmesi süresince büyük ölçüde uzadığını belirtmiştir.

Harrison ve Harrison (1982)'da *Trifolium pratense* L.'nin diploid formlarında stilusun uzun olduğunu, stilus boyunca uzanan ve lisigen olarak meydana gelen bir kanalın bulunduğunu belirtmişlerdir. Biz de örneklerimizde, ovaryum boşluğu ile stigma tepesinin alt kısmı arasında polen tübünün rahatlıkla ilerleyebileceği devamlı bir kanalın bulunduğunu gözledik. Harrison ve Harrison (1983) bizim örneklerimizde olduğu gibi stigmanın pek çok papilla ile çevrili bir yüzeye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Fedorchuk (1944) yaptığı çalışmasında bir tohum taslağı içinde 1 ile 5 arasında ana hücre gözlemiş ve aynı tohum taslağında 2 megaspor tetradına rastlamıştır. Halbuki biz örneklerimizde, megasporogenez süresince tohum taslağı içinde yalnızca bir megaspor tetradının teşekkül ettiğini tespit ettik. Araştırmamızda, kömeç boyu ortalaması 11.52 mm olan T₂ örneklerinde çiçek tozu kese-

lerinin çiçek tozlarını döktükleri ve bu boydaki örneklerden alınan kesitlerde dişi organın gelişmesini henüz tamamlamadığı gözlenmiştir. Buna paralel olarak, Krupko (1973) *Trifolium alexandrinum* L.'nin Palestine çeşitinde de embriyo kesesi gelişimi ile polenlerin olgunlaşması arasında bir ilişki olmadığını belirtmiştir.

Daha öncede bahsedildiği gibi Fedorchuk (1944) çalışmasında 5 mm boyundaki bir çiçek tomurcuğunda embriyo kesesinin gelişmesini tamamladığını belirtmiştir. Halbuki, biz çalışmamızda dişi organ gelişmesinin farklı gelişme evrelerinden aldığımız 5 farklı boydaki örneklerde, (Çizelge 2.2.1'de görüldüğü gibi) kömeç boyu ortalaması 16.76 mm ve çiçek boyu ortalaması 10.33 mm olan T_3 örnekleri ile kömeç boyu ortalaması 22.76 mm ve çiçek boyu ortalaması 14.13 mm olan T_4 örneklerinde olgun kesenin teşekkül ettiğini gördük. Hindmarsh (1963) diploid *T. pratense* L. üzerinde yaptığı çalışmasında gametogenez süresince kesenin mikropil tarafında 2,3 hücre sırasının bulunduğunu ve bu hücrelerin döllenmeyi etkilediğini belirtmiştir. Bizde sadece T_2 örneklerinde gördüğümüz 2 çekirdekli embriyo kesesinde mikropil tarafında 2-3 hücre sırasının bulunduğunu gözledik. Ancak daha sonra ortadan kalkan bu hücrelerin döllenmeye mani olamayacağı sonucuna vardık. Çalışmamızda kömeç boyu ortalaması 22.76 mm olan T_4 örneklerinin birkaç tanesinde döllenmiş yumurta hücresi ve sekonder çekirdeği gözledik. Yine aynı örneklerin birinde 2 hücreli proembriyoya rastladık. Kömeç boyu ortalaması 21.64 mm olan T_5 örneklerinden alınan kesitlerde ise, sadece bir ovaryumda olgun embriyonun teşekkül ettiğini tespit ettik. Örneklerimizde 2 hücreli proembriyonun daha ileri safhalarına ve endosperm çekirdeklerine rastlamadık. Bu bulgularımızda, Krupko (1973)'nün çalışmasındaki sonuçları desteklemektedir. İki hücreli proembriyonun bulunduğu keselerde endosperm çekirdeklerinin bulunmayışı kesede tek döllenmenin meydana geldiğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki gözlemlerimiz, dişi gametofit dölde gelişmenin çeşitli safha-

larında, gelişme bozuklukları ve dejenerasyonların meydana geldiğini göstermiştir. Örneklerimizin bir kısmında da her bir tohum taslağı içinde orijini farklı olan iki ayrı embriyo kesesi gelişmesi tespit ettik. Bu sonuçta, Fedorchuk (1944) ve Hindmarsh (1963)'ın bulgularını desteklemektedir. Bu araştırmacılar, gelişmenin bazı safhalarında aynı tohum taslağı içinde iki farklı kesenin geliştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Fedorchuk (1944) çalışmasında, kalazal embriyo kesesindeki yumurta aygıtının ters bir yapı göstermesinin bu kesenin karakteristik bir özelliği olduğunu belirtmiştir. Biz örneklerimizde böyle bir duruma rastlamadık ve kalaza tarafındaki embriyo kesesinde yumurta aygıtının teşekkülünü gözlemedik. Örneklerimizde kalaza tarafında gelişen embriyo kesesinde, gelişmenin başlangıç evrelerinde dejenerasyon belirtileri gözlenmiş ve bu kesenin normal kese boyutuna ulaşmadan bozulduğu tespit edilmiştir.

Melezlemeler sonucu oluşan bitkilerde, gelişmenin çeşitli evrelerinde, erkek ve dişi gametofit döllerde bazı anormallikler gözlediklerini bildiren Kazımierski ve Kazımierska (1975) *Lupinus luteus* L.'nin yabancı formu ile kültür çeşidini melezlemişler ve melez bitkide polen ana hücrelerin de mayoz bölünmenin düzensiz olduğunu bildirmişlerdir. *Trifolium* cinsinden bazı türler ile **T. pratense** L.'nin melezlenmesi üzerinde çalışmalar yapan Kazımierska (1978a) ise, melezlemeler sonucu ortaya çıkan aksaklıkların türlerdeki gen yapılarının uyumsuzluğundan kaynaklandığını belirtmiştir.

Yine aynı araştırmacı (1978b) **T. repens** L. ile **T. medium** L.'nin çaprazlanmasından elde edilen melez bitkide embriyoların ölmesinin sebebini, zigottaki genom homolojisinin yetersizliğinden kaynaklandığını söylemiştir. Bu yaklaşımla bizim materyalimizde doğal tetraploid bir materyal olduğu gözönüne alınırsa, dişi gametofitte dejenerasyonların çok sık görülmesi bu bitkide de melezlenme olması ihtimalini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlardan da anlaşıldığı gibi, *Trifolium pratense* L.'de olgunluğa ulaşmadan gelişmelerinin erken safhalarında keselerin dejenere olmasının

yanında tohum bağlama oranının olgun kese oranından daha düşük olması dölleme olayında da bazı başarısızlıkların meydana gelebileceği fikrini vermektedir.



5. KAYNAKLAR

- Elçi, Ş., 1982. The utilization of genetic resources in fodder crop breeding. Eucarpia. Fodder Crop Section. 13-16 September, 1982, Aberystwyth, U.K.
- Fedorchuk, V.F., 1944. Development and structure of ovules and seeds in red clover (*Trifolium pratense* L.) Moscow Ordene Lenina Sel'sk. Akad. Im. K.A. Timiriaseva Trud. 25:1-39.
- Gök, M.F., 1988. Ankara şartlarında, doğal tetraploid Elçi Çayırüçgüğü (*Trifolium pratense* L.) seçme klonlarında melezlenme ve tohum tutma farklılıklarının belirlenmesi A.Ü. Ziraat Fak. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Ankara.
- Harrison, H.J. ve Harrison, H.Y., 1982. Pollen-stigma interaction in the leguminosae: Constituents of the stylar fluid and stigma secretion of *Trifolium pratense* L. Ann.Bot. 49(6):729-735.
- Harrison, H.Y. ve Harrison, H.J., 1982. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: the secretory system of the style in *Trifolium pratense* L. Ann.Bot. 50(5):635-645.
- Harrison, H.J. ve Harrison, H.Y., 1983. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: organization of the stigma in *Trifolium pratense* L. Ann.Bot. 51:571-583.
- Hindmarsh, G.J., 1964. Gametophyte development in *Trifolium pratense* L. Aust. Jour. Bot. 12: 1-14.
- Hughes, H.D., Health, M.E ve Metcalfe, D.S., 1967. Forages. The Sci. Grassl. Agric. The Iowa State Univ. Press. U.S.A.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book company. Inc. New York. London.

- Kazimierska, E.M., 1978a. Embryological studies of cross compatibility in the genus *Trifolium* L.I. hybridization of *Trifolium pratense* L. with some species in the subgenus *Lagopus* Bernh. *Genet. Pol.* 19(1):1-14.
- Kazimierska, E.M., 1978b. Embryological studies of cross compatibility in the genus *Trifolium* L. II. Fertilization, development of the embryo and endosperm in crossing *Trifolium repens* L. with *T. medium* L. *Genet. Pol.* 19(1):15-22.
- Kazimierski, T. ve Kazimierska, E.M., 1970. Megasporogenesis and embryo sac development in haploids of Yellow Lupin (*Lupinus luteus* L.) *Genet. Pol.* 11(3/4): 349-354.
- Kazimierski, T. ve Kazimierska, E.M., 1975. Cytogenetics of the hybrid between a cultivar variety and a wild form of Yellow Lupin (*Lupinus* L.) *Genet. P.* 11(2): 55-68.
- Kazimierski, T. ve Kazimierska, E.M., 1979. Inheritance of changes conditioned by the leaf reducing gene in Swedish clover (*Trifolium hybridum* L.) *Acta.Soc.Bot.Pol.* 48(2): 239-253.
- Kazimierski, T. ve Kazimierska, E.M., 1979. structure of embryo sac, fertilization and development of embryo in Swedish clover (*T.hybridum* L.) plants with reduced leaves. *Acta. Soc.Bot.Pol.* 48(3):365-376.
- Krupko, S., 1973. Megasporogenesis and development of the embryo sac in the Palestine variety of *Trifolium alexandrinum* L. *Acta. Soc.Bot.Pol.* 42(4): 617-625.
- Mackiewicz, T., 1970. Embryo and seed development in Octoploid White clover (*Trifolium repens* L.) *Genet.Pol.* 11(3/4): 355-356.

- Özbek, H., 1980. Doğu Anadolu Bölgesinde Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.)'nü tozlayan arılar (Hymenoptera: Apoidea). Doğa seri A.-Math.Phys.Biol.Sci. 4(2): 61-66.
- Sawai, A. ve Ueda, S., 1987. Embryo development of the hybrid of *Trifolium medium* L. x 4 x *Trifolium pratense* L. Jour. Jap. Soc. Grassl. Sci. 33(22):157-162.
- Taylor, N. ve Chen, K., 1988. Isolation of trisomics from crosses of diploid, triploid and tetraploid Red clover (*Trifolium pratense* L.). Crop Science 28(2): 209-213.

20 ref.

T. C.
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
Dokümantasyon Merkezi