

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

***TRIFOLIUM PRATENSE* L. (ELÇİ ÇAYIRÜÇGÜLÜ-FABACEAE)' DE
İNTEGÜMENT GELİŞİMİ**

Hatice Nurhan BÜYÜKKARTAL¹

ÖZ

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü)' de tohum taslaklarının gelişimi, olgun embriyo kesesi, zigot ve proembriyo evrelerinde integümentlerin geçirdiği histolojik ve sitolojik değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmıştır.

Farklı gelişme evrelerindeki çiçek tomurcukları ve çiçek örneklerinden alınan dışı organlar hem parafine hem de epon 812 içine yerleştirilmiştir. Tohum taslağı gelişimi, olgun embriyo kesesi, zigot ve proembriyo evrelerinde integüment hücrelerinin yapısı ışık ve geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü)'de tohum taslakları kampilotrop, iç ve dış olmak üzere iki integümentlidir. Mikropil her iki integümentten meydana gelir. İki integüment primordiumu da tabandan çıkarak farklılaşır. Megaspor ana hücresi profaz I' in erken evresindeyken integümentler gelişmeye başlar. Olgun embriyo kesesi evresinde iç integüment iki hücre kalınlığındadır ve tamamen nusellusu örter. Dış integüment çok kalındır ve bu integümentlerden biri daha çabuk gelişerek iç integümentlerin birleşme yerini örterek diğer dış integümentle birleşir.

Bu bitkide tohum taslağı, embriyo kesesi, zigot ve proembriyo gelişimi süresince gerekli besin maddelerinin integüment hücrelerinde depo edildiği ve iletiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İntegüment gelişimi, *Trifolium pratense* L., Tohum taslağı, Fabaceae.

**DEVELOPMENT OF THE INTEGUMENT IN *TRIFOLIUM PRATENSE* L. (ELÇİ
ÇAYIRÜÇGÜLÜ-FABACEAE)**

ABSTRACT

This study aims to reveal the histological and cytological changes undergone by integument cells in natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü) in the stages of proembryo, zygote, mature embryo sac and throughout ovule development.

Female organs of flowers buds and flowers sampled from those at different developmental stages were embedded both in paraffin and epon 812. The structure of integument cells was examined in the

¹Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Tandoğan, Ankara-Türkiye.
E-mail: bkartal@science.ankara.edu.tr Fax. 0 (312) 2232395

stage of mature embryo sac and throughout ovule development by a light and a transmission electron microscopy.

The ovules in natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü) have two integuments, namely inner and outer integuments. The primordia of both integuments start to appear from the medial part, chalaza. While the megaspore mother cell is in earlier stage of Prophase I, integuments start to develop. In the stage of mature embryo sac, the inner integument is two-cells thick and it fully covers the nucellus. The outer integument becomes thicker and thicker, and one of the cells grown faster covers the junction of inner integuments and joins with the other outer integument.

It was concluded that necessary nutrients were sufficiently stored and transmitted in integument cells during the stages of ovule, embryo sac, zygote and proembryo development in natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü).

Keywords: Integument development, *Trifolium pratense* L., Ovule, Fabaceae.

1. GİRİŞ

Tohum taslakları bitkilerin yaşam çevriminde önemli bir yere sahiptir ve bitkilerde organogenez çalışmaları için iyi birer modeldirler (Reiser L. and Fischer 1993, Gasser vd. 1998, Skinner vd. 2004; Colombo vd. 2008; Kelley and Gasser 2009; Kelley vd. 2009).

Tohum taslakları genellikle bir veya iki integüment taşır. Tek integümentli tohum taslakları unitegmik, iki integümentliler bitegmik olarak isimlendirilirler (Ünal 2004).

Angiospermlerde iç integüment dermal, dış integüment ise genellikle subdermal kökenlidir (Bouman 1974; Johri 1984; Galati vd. 2006). Integümentlerin sayısı familyaların evölüsyonları ile ilişkilidir (Johri vd. 1992).

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü)'de tohum taslakları kampilotrop, iç ve dış olmak üzere iki integümentlidir. Mikropil her iki integümentten meydana gelir (Algan ve Bakar 1990). Integümentlerin farklılaşması, tohum taslağı gelişiminin erken evresinde önce iç integümentte endotelyum (integüment tapetumu) teşekkülü ile başlar (Bakar ve Algan 1997). Bu çalışmada, doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü)' de tohum taslaklarının gelişimi sırasında, olgun embriyo kesesi evresinde, zigot ve proembriyo evrelerinde integümentlerin geçirdiği histolojik ve sitolojik değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü) ($2n=4x=28$) E2 (Elçi, 1982) çeşitine ait bitkiler tarla şartlarında yetiştirilmiştir. Işık ve elektron mikroskobu çalışmaları için

farklı gelişme evrelerine ait (Tablo 1) çiçek tohumcuğu ve çiçek örneklerinden çıkarılan dış organlar alkol-asetik asit (3:1)'de tespit edilmiş ve parafine gömülen materyallerden 8-12 µm. kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler Heidenhain Fe'li hema- toksilen ile boyanmıştır. (Algan 1981).

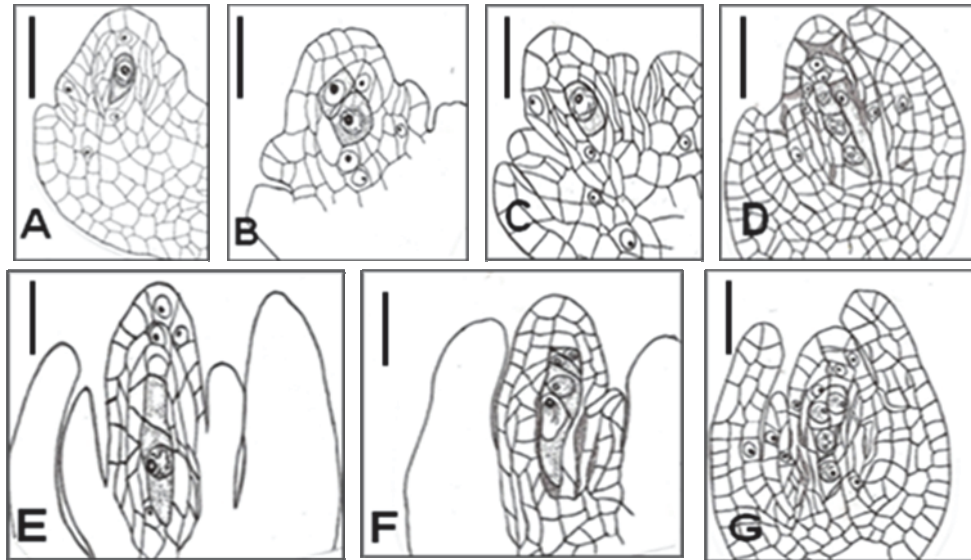
Elektron mikroskobu çalışmaları için örnekler önce %3'lük gluteraldehit ile daha sonra da % 1'lik osmium tetraoksit ile tespit edilmiştir. Dehidrasyon ve doyurma işlemlerinden sonra örnekler Epon 812 içine yerleştirilmiştir. (Luft 1961). Yarı ince kesitler metilen mavisi ve toluidin blue ile boyanmıştır. İnce kesitler ise, uranil asetat (Stempak and Ward 1964) ve kurşun sitrat (Sato 1967) ile boyandıktan sonra JEOL CX-100 geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. İncelenen tohum taslağı sayısı 677 adettir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Megasporogenez evresinde integüment gelişimi: Ovaryum boyu 250 µm ile 400 µm arasında olan incelenen tohum taslaklarında iki integüment primordiumunun tabandan çıkarak farklılaştığı görüldü. Megaspor ana hücresi profaz I' in erken evresindeyken integümentler gelişmeye başlar (Şekil 1A). Dyad evresinde integümentlerin belli olmaya başladığı ve farklılaştığı gözlemlendi (Şekil 1B-C). Ovaryum boyu 400 µm - 550 µm arasında olan örneklerde tohum taslaklarında megaspor tetrad evresinde iken integümentler uzamaya devam etmektedirler (Şekil 1D-G). Ovaryum boyu 550 µm - 750 µm arasında olan örneklerde tohum taslaklarında iç integümentler hemen hemen eşit boydadır ve henüz nusellusu tamamen kuşatmamışlardır.

Tablo 1. Işık ve elektron mikroskobu çalışmaları için dişi organ gelişmesinin farklı gelişme evrelerinden alınan örnekler.

Örneklerin alındığı evreler	Örneklerin alındığı evrelerde integümentlerin durumu	Ovaryum boyu (μm)	İncelenen tohum taslağı sayısı (adet)
Tomurcuk başlangıcı	İntegümentler henüz belirmemiş	250 μm - 400 μm	207
Tomurcuk	İntegümentler farklılaşmaya başlamış	400 μm - 550 μm	233
İleri tomurcuk evresi	İntegümentler gelişmiş fakat nusellusu tamamen kuşatmamış durumda	550 μm - 750 μm	128
Çiçek	İntegümentler nusellusu kuşatmış durumda	750 μm - 950 μm	109
TOPLAM			677

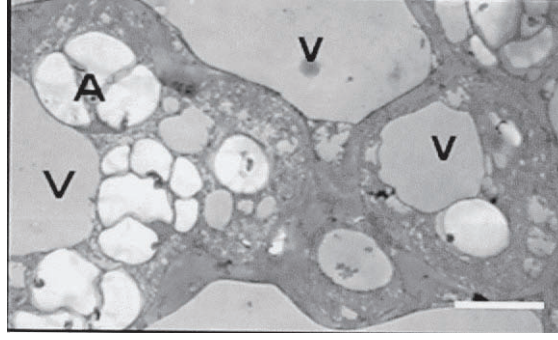


Şekil 1A-G. *Trifolium pratense* L.'de megasporogenez evresinde integümentlerin gelişimi Bar=100 μm .

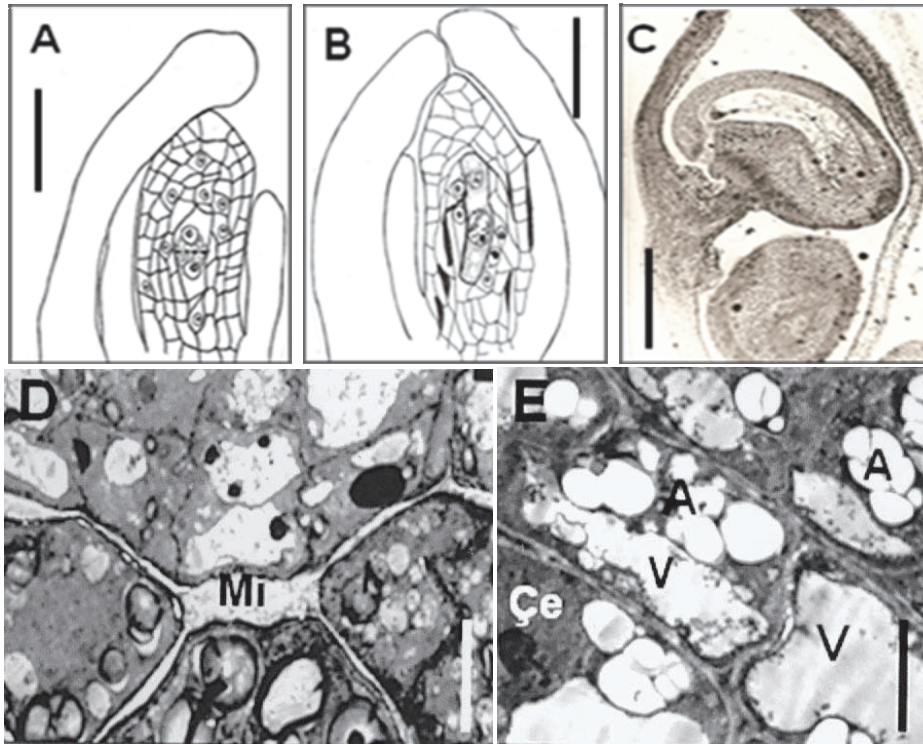
Megasporogenez evresinde integüment hücrelerinde nişasta içeren amiloplastlar bütün sitoplazmada dağılmış durumdadır. Nişasta taneleri elektronca şeffaftır. Genellikle hücrelerin merkezine yakın büyük bir vakuol ile farklı büyüklükte vakuollere rastlanmıştır (Şekil 2).

Megagametogenez evresinde integüment gelişimi : Ovaryum boyu 750 μm - 950 μm arasında olan megagametogenez evresindeki tohum taslaklarında, integüment hücre sayıları artar ve tohum taslaklarının bükülmesiyle mikropil funikulusa yaklaşır (Şekil 3A-B). Kampilotrop tohum taslağı son şeklini alır (Şekil 3C). Bu evrede elektron mikroskobu incelemelerinde mikropil tarafındaki integüment hücrelerinde

nişasta içeren amiloplastların megasporogenez evresine oranla yoğun olduğu gözlenmiştir. Amiloplastlar elektronca şeffaftır. (Şekil 3D). Bazı hücrelerde elektronca yoğun büyük bir çekirdek mevcuttur. Hücre çeperleri ise dalgalı ve kalındır (Şekil 3E). Bazı hücrelerde lipid ve protein cisimcikleri de gözlenmiştir.



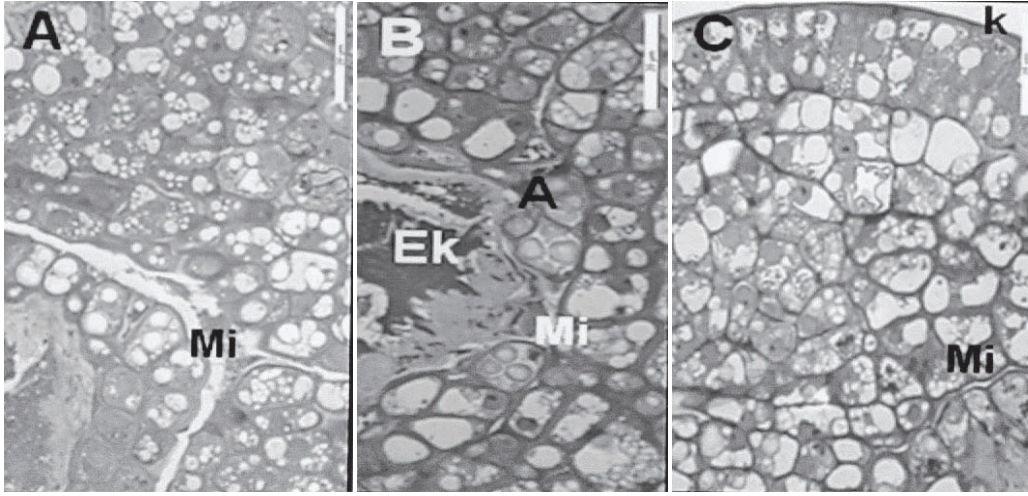
Şekil 2. *Trifolium pratense* L.'de megasporogenez evresinde integument hücrelerinin elektron mikrofografı. Bar = 5µm.



Şekil 3A-C. *Trifolium pratense* L.'de megagametogenez evresinde integumentlerin gelişimi Bar=100 µm. D. Mikropil tarafındaki integument hücrelerinin elektron mikrofografı. Bar = 1µm. E. Büyük çekirdekli ve kalın çeperli hücreler Bar = 3µm.

Olgun embriyo kesesi evresinde integument gelişimi : Olgun embriyo kesesinin meydana gelmiş olduğu örneklerde iç integument iki hücre kalınlığındadır ve tamamen nusellusu örter. Dış integument çok kalındır (6-8 hücre sırası) (Şekil 4A). Bu evrede özellikle mikropile yakın integument hücrelerinde amiloplastların yoğun olduğu ve koyu boyandıkları, bazı hücrelerde hücrenin içini tamamen doldurdukları gözlenmiştir (Şekil 4B). Mikropile yakın bu hücrelerin bir kısmında çekirdek kenardadır. Büyük bir vakuol hücrenin tamamını kaplar ve sitoplazma kenara itilmiştir. Hücre çeperleri bir önceki evreye oranla oldukça kalınlaşmıştır. Dış

integumentin epidermis hücreleri boyuna uzar, büyük çekirdekli ve bol nişasta içerirler. Boyuna uzayan bu hücrelerin üzerinde kalın ve koyu boyanmış bir kutikula tabakası mevcuttur. (Şekil 4C). Epidermis hücrelerinin altındaki hücrelerde bölünerek büyümelerini olgun tohum meydana gelene kadar sürdürürler.



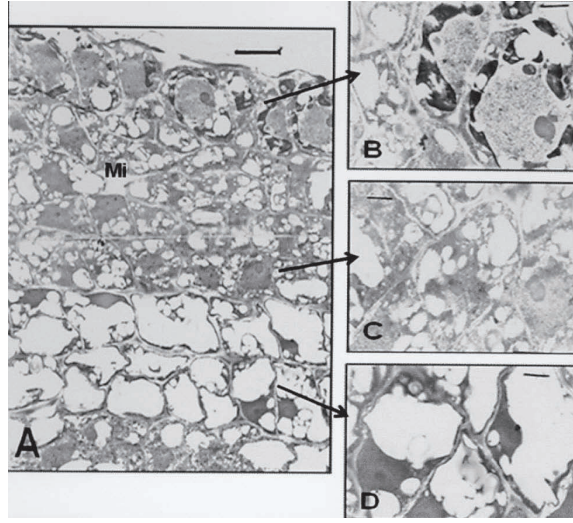
Şekil 4A. *Trifolium pratense* L.'de olgun embriyo kesesi evresinde, integüment hücreleri. B. mikropile yakın integüment hücrelerinde bulunan amiloplastlar. C. Boyuna uzayan dış integüment hücrelerinin üzerinde bulunan kalın kutikula tabakası. Bar = 20 µm. Mi. Mikropil, A. Amiloplast, k. Kutikula tabakası.

Arabidopsis thaliana'da dış integüment hücrelerinin morfolojik farklılaşmasını inceleyen Windsor et al. (2000), de integümentlerin olgun tohum oluşuncaya kadar gelişme gösterdiklerini bildirmişlerdir. İç integümentin kalp-şekilli embriyo evresinde dejenere olduğu (Yeung and Cavey 1990; Borisjuk 1995; Bakar ve Algan 1997; Riahi et al. 2003), dış integümentin ise proembriyo evresinde karakteristik olgun testa morfolojisi göstermeye başladığı, Fakat maksimum genişlik ve farklılaşmasına embriyonun kalp-şekilli evresinde ulaştığı bildirilmiştir (Chamberlin et al. 1994; Algan ve Bakar Büyükkartal 2000).

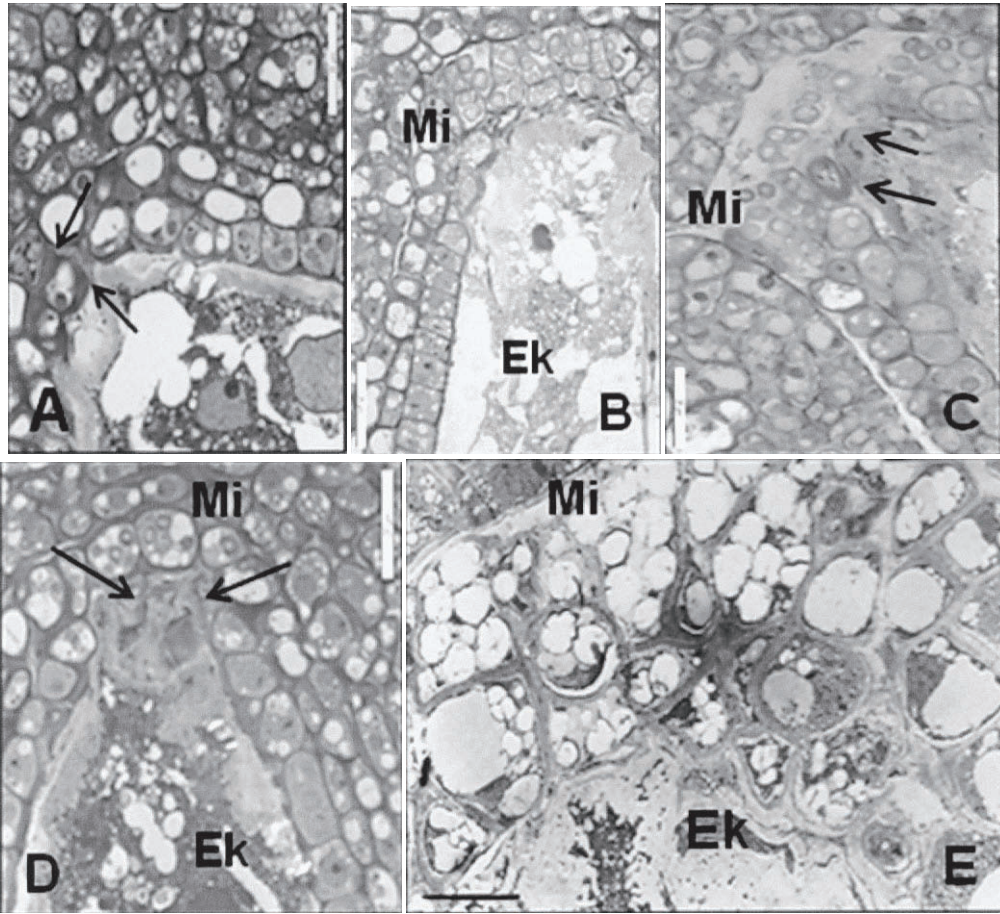
Olgun embriyo kesesi evresinde; elektron mikroskobu incelemelerinde dış integüment hücrelerinin üzerinde kalın bir kutikula tabakasının bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 5A). İnce çepirli ve yoğun sitoplazmalı olan hücrelerde elektronca yoğun büyük bir çekirdek mevcuttur (Şekil 5B). Çekirdek çevresindeki vakuollerde bol miktarda tanin bulunmaktadır. Çeşitli büyüklükte vakuol içeren hücrelerde nişasta içeren amiloplastlar, lipid ve protein cisimcikleri de yoğundur. Dış integüment hücrelerinin altındaki hücreler de büyük çekirdekli ve yoğun sitoplazmalıdırlar (Şekil 5C). İç integümente yakın olan hücreler ise büyük vakuollü ve nişasta bakımından zengindir. Bu hücrelerde de çekirdek büyük, yoğun ve hücre çepirine yakın yer alır. Çekirdek elektronca yoğun görünmektedir. (Şekil 5D). Hücre çepirleri daha kalındır. Bu hücrelerin kalınlaşmış olan çepirlerinde orta lamel daha net olarak görülür. İnce çepirlerde plazmodesmalar yoğundur.

Zigot evresinde integüment gelişimi : Zigot evresinde dış integüment 6-10 hücre sırası kalınlığındadır. Bu evrede mikropil tarafındaki integüment hücrelerinde oldukça koyu boyanmış nişasta içeren amiloplastların yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 6A ve B). Embriyo kesesinin mikropil tarafındaki integüment hücrelerinin bazısında çepirlerin eridiği ve nişasta tanelerinin serbest kaldığı saptanmıştır (Şekil 6C ve D). Mikropil tarafında embriyo kesesi çepirinin bazı bölgelerde parmak şeklinde ince uzantılar meydana getirmesi muhtemelen besinlerin integümentlerden embriyo kesesine iletiildiği fikrini düşündürmektedir. Elektron mikroskobu incelemelerinde de mikropil tarafındaki integüment hücrelerinde bol miktarda nişastalı amiloplastlara rastlanmıştır (Şekil 6E).

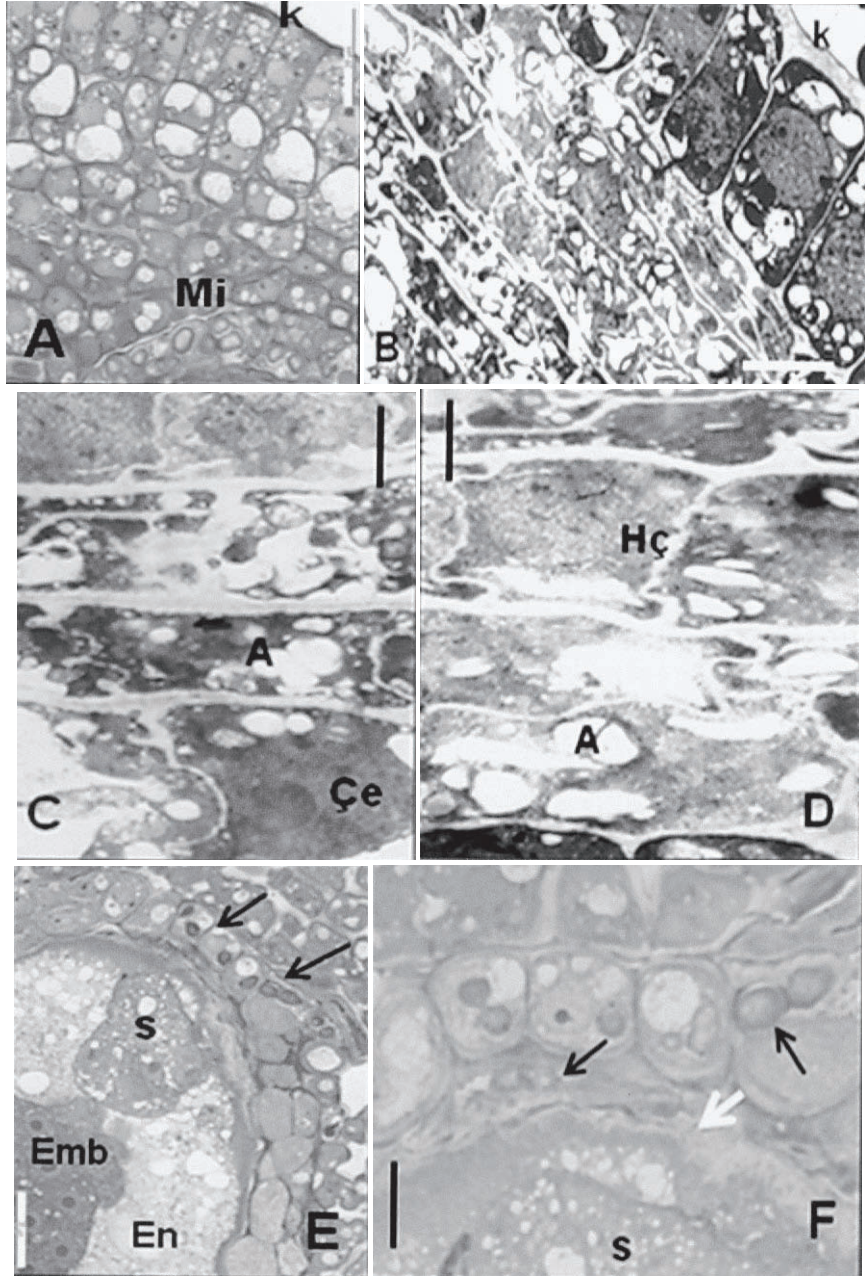
Proembriyo evresinde integüment gelişimi : Bu evrede dış integüment hücreleri boyuna uzamış ve yoğun sitoplazmalıdırlar. Hücrelerin merkezinde büyük bir çekirdek, üst kısmında kalın ve koyu boyanmış bir kutikula tabakası mevcuttur (Şekil 7A). Elektron mikroskopik incelemelerde kutikula tabakasının elektronca şeffaf olduğu gözlenmiştir (Şekil 7B). Alt kısımdaki integüment hücrelerinde nişasta içeren amiloplastların zigot evresine oranla daha az olduğu gözlenmiştir. Bazı hücrelerde elektronca yoğun büyük bir çekirdek mevcuttur (Şekil 7C). Hücre çepirleri ise dalgali ve kalındır (Şekil 7D). İleri proembriyo evresinde, embriyo kesesi çepirine yakın integüment hücrelerinde koyu boyanmış nişasta tanelerinin (Şekil 7E) hücre çepirlerinin erimesiyle serbest kaldıkları, muhtemelen hidrolitik enzimlerin komşu integüment dokusuna salınmasıyla besin maddelerinin buradaki çepir uzantılarıyla (Şekil 7F) embriyo kesesine iletildikleri düşünülmektedir.



Şekil 5A-D. *Trifolium pratense* L.'de olgun embriyo kesesi evresinde integument hücrelerinin elektron mikrografları. A. Dış integument hücreleri Bar = 1 µm. B. Büyük çekirdekli ve ince çeperli hücreler Bar = 2 µm. C. Dış integument hücrelerinin altındaki hücreler Bar = 2 µm. D. İç integümente yakın olan hücreler Bar = 2 µm. Mi. Mikropil



Şekil 6A-E. *Trifolium pratense* L.'de zigot evresinde integument hücreleri. A ve B. Mikropile yakın integument hücrelerindeki amiloplastlar (ok ile gösterilen) Bar = 20 µm. C ve D. Çeperlerin erimesiyle serbest kalmış nişasta taneleri (ok ile gösterilen) Bar = 20 µm. E. Mikropile yakın integument hücrelerinin elektronmikrografı Bar = 2 µm. Mi. Mikropil, Ek. Embriyo kesesi.



Şekil 7A-F. *Trifolium pratense* L.'de proembriyo evresinde integüment hücreleri. A. Dış integüment hücrelerinin üzerindeki kalın kutikula tabakası. Bar = 20 µm. B-D. Dış integüment hücrelerinin elektronmikrografı B:Bar = 5µm. C-D: Bar = 2 µm. E-F. Embriyo kesesi çeperine yakın integüment hücrelerinde koyu boyanmış nişasta taneleri (ok ile gösterilen). Bar = 20 µm. Mi. Mikropil, k. Kutikula, A. Amiloplast, Çe. Çekirdek, Hç. Hücre çeperi, S. Suspensor, Emb. Embriyo, En. Endosperm.

Mogensen (1973) *Quercus gambelli*' de dış integüment hücrelerinin nişasta bakımından zengin olduğunu belirtmiş ve bu bitkide tohum taslağı içine besinlerin naklinin dış integümentten kalazaya doğru olduğunu düşünmüştür. Çalışılan bir çok türde ise, endotelyum (integüment tabakasının dış dokulardan besinleri absorbe ettiği ve sonra embriyo kesesine verdiği düşünülür (Yeung and Cavey 1990; Johansson

and Walles 1993; Jakobsen et al. 1994; Bakar ve Algan 1997).

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi Çayırüçgülü)' de tohum taslaklarının gelişimi sırasında, olgun embriyo kesesi evresinde, zigot ve proembriyo evrelerinde integümentlerin geçirdiği histolojik ve sitolojik değişikliklerin saptandığı bu çalışmada, gerekli besin madde-

lerinin integüment hücrelerinde depo edildiği ve iletildiği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında değerli katkıları ve materyalin sağlanmasından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ'ye teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

Algan, G. (1981). *Bitkisel Dokular için Mikro-tekniik*. Fırat Üniversitesi Yayınları, Bot.No: 1.

Algan, G. ve Bakar, H.N. (1990). Doğal tetraploid Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.)'nde embriyo kesesi gelişmesi ve yumurta teşekkülünün incelenmesi. *Turkish Journal of Botany* 15, 57-70.

Algan, G. ve Bakar Büyükkartal, H.N. (2000). Ultrastructure of seed coat development in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Journal of Agronomy and Crop Science* 184, 205-213.

Bakar, H.N. ve Algan, G. (1997). Electron microscopic examination of the development of the endothelium in *Trifolium pratense* L. during development. *Doğa Turkish Journal of Botany* 21(3), 137-144.

Borisjuk, L., Weber, H., Panitz, R., Manteuffel, R. and Wobus, U. (1995). Embryogenesis of *Vicia faba* L.: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *Journal of Plant Physiology* 147, 203-218.

Bouman, F. (1974). Developmental studies of the ovule, integuments and seed in some angiosperms. Thesis Univ. Amsterdam.

Chamberlin, M.A., Horner, H.T. and Palmer, R.G. (1994). Early endosperm, embryo, and ovule development in *Glycine max* (L.) Merr. *International Journal of Plant Science* 155, 421-436.

Colombo, L., Battaglia, R. and Kater, M.M. (2008). *Arabidopsis* ovule development and its evolutionary conservation. *Trends Plant Science* 13, 444-450.

Elçi, Ş. (1982). The utilization of genetic resource in fodder crop breeding, *Eucarpia Fodder Crop Section* 13-16 September, Aberystwyth UK.

Galati, B.G., Rosenfeldt, S. and Tourn, M. (2006). Embryological studies in *Lotus glaber* (Fabaceae). *Annals of Botany Fennici* 43, 97-106.

Gasser, C.S., Broadhvest, J. and Hauser, B.A. (1998). Genetic analysis of ovule development. *Annual Reviews of Plant Physiol and Plant Molecular Biology* 9, 1-24.

Jakobsen, H.B., Martens, H. and Lyshede, O.B. (1994). Accumulation of metabolites during seed development in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74, 409-415.

Johansson, Q.M. and Walles, B. (1993). Functional anatomy of the ovule in broad bean (*Vicia faba* L.), I. Histogenesis prior to and after pollination, *International Journal of Plant Science* 154, 80-89.

Johri, B.M. (1984). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, Tokyo, 830.

Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. and Srivastava, P.S. (1992). *Comparative Embryology of Angiosperms*. Springer. Berlin.

Kelley, D.R. and Gasser, C.S. (2009). *Ovule development: genetic trends and evolutionary considerations* Sex Plant Reprod Springer Berlin / Heidelberg.

Kelley, D.R., Skinner, D.J. and Gasser, C.S. (2009). Roles of polarity determinants in ovule development. *The Plant Journal* 57, 1054-1064.

Luft, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9, 409-414.

Mogensen, H.L. (1973). Some histochemical, ultrastructural, and nutritional aspects of ovule of *Quercus gambelli*. *American Journal of Botany*. 60, 48-54.

Reiser, L. and Fischer, R.L. (1993). The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell* 5, 1291-1301.

- Riahi, M., Zarre, S., Chehregani, A. and Shahsavan-Behboudi, B. (2003). Seed development in two species of medifixed hairy *Astragalus*(Fabaceae). *Flora* 198, 211-219.
- Sato, J.E. (1967). A modified method for bad staining of thin sections. *Journal of Electron Microscopy* 16, 133.
- Skinner, D.J, Hill, T.A. and Gasser, C.S. (2004). Regulation of ovule development. *Plant Cell* 16, 532-545.
- Stempak, J.G. and Ward, R.T. (1964). An improved staining method for electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 22, 697.
- Ünal, M. (2004). *Bitki (Angiosperm) Embriyolojisi*. Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 11.
- Yeung, E.C. and Cavey, M.G. (1990). Developmental changes in the inner epidermis of the bean seed coat. *Protoplasma* 154, 45-52.
- Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J. and Lloyd, A.M. (2000). Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal* 22(6), 483-493.