

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü) dişi gametofitinde filiform aygıtının yapısı

H. Nurhan BÜYÜKKARTAL^{1*}

¹Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Tandoğan, Ankara

Özet

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü)'de filiform aygıt (FA)'nın yapısı embriyo kesesinde sinerjit hücrelerinin mikropil ucunda son derece kalınlaşmış yapı ışık ve geçirmeli elektron mikroskobu ile olgun embriyo kesesi evresinde incelenmiştir. Farklı gelişme evrelerindeki çiçek tomurcuklarından alınan dişi organlar hem parafine hem de epon 812 içine gömülmüştür.

Sinerjit hücrelerinin farklı kısımlarında kalınlaşmış bir yapı halinde olan filiform aygıt ışık mikroskobunda kep şeklinde görünmektedir. Filiform aygıt oldukça koyu boyanır. Geçirmeli elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler, sitoplazmaya doğru filiform aygıt yüzeyinin çok sayıda düzensiz girinti çıkıntılar ve loblardan oluştuğu gözlenmiştir. Filiform aygıt ile ilişkili sitoplazmada çok miktarda mitokondriler, ribozomlar, diktiyozomlar, ER kitleleri, lipid ve protein cisimcikleri, büyük nişasta taneleri içeren amiloplastlar ve vesiküller gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Trifolium pratense* L., olgun embriyo kesesi, filiform aygıt.

The structure of the filiform apparatus in the female gametophyte of the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü)

Abstract

The structure of the filiform apparatus (FA) - a highly thickened structure at the micropylar end of the synergid cells in mature embryo sac - of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü) was examined in the stage of mature embryo sac by a light and a transmission electron microscopy. Female organs of flower buds sampled from those at different developmental stages were embedded both in paraffin and epon 812.

The filiform apparatus, which exists as a thickened structure in different parts of synergid cells, is seen in the form of a cap under light microscopy. It is stained quite dark. The investigations with transmission electron microscopy showed that the surface of filiform apparatus towards cytoplasm is composed of numerous irregular walls ingrowths and lobes.

The cytoplasm associated has a rich a point of mitochondria, ribosomes, dictyosomes, ER masses, lipid and protein bodies, amyoplasts containing large starch grains and vesicles.

Key Words: *Trifolium pratense* L., mature embryo sac, filiform apparatus.

* Yazışma Adresi: e-posta: bkartal@science.ankara.edu.tr

1. Giriş

Dişi gametofit (embriyo kesesi) doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü)' de yedi hücreden oluşan bir yapıdır [1]. Kesenin mikropil yönünde bir yumurta hücresi ve iki sinerjitten oluşan bir yumurta aygıtı, merkezde iki polar nukleus içeren merkezi bir hücre ve kalaza tarafında da üç antipod hücresi bulunur. Bu tip gelişme pek çok bitkide görülür [2-10] ve polygonum tip olarak isimlendirilir.

Trifolium pratense L (Elçi çayırüçgülü)' de olgun embriyo kesesinde sinerjit hücrelerinin mikropil tarafındaki çeperi kalınlaşarak sitoplazma içine doğru girintili çıkıntılı ve loblu bir yapı göstermektedir. Filiform aygıtı olarak isimlendirilen bu yapının bir çok türde muhtemelen sinerjit hücrelerinin fonksiyonunda kritik bir rol oynadığı, polen tüpünün büyümesinde ve embriyo kesesine girişinde rolü olduğu belirtilmiştir [4,11-15].

Schulz ve Jensen [16], *Capsella bursa pastoris*'de sinerjit hücre çeperinin mikropile doğru kalınlaştığını ve bu kısımda kompleks bir filiform aygıtının mevcut olduğunu ve bu aygıtın iki yapısal fazdan oluştuğunu ifade etmişlerdir. *Aquilegia formosa*' da olgun embriyo kesesinin mikropil kısmında filiform aygıtının düzenli uzantılar yaparak sinerjit sitoplazmasına uzandığı bildirilmiştir [17]. Newcomb [18] ise, *Helianthus annuus*'un olgun embriyo keselerinde farklı filiform aygıtını tiplerine rastlandığını belirtmiştir.

Bu çalışmada tohum bağlama oranı düşük olan doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü)'nin olgun embriyo kesesinde, filiform aygıtının histolojik ve sitolojik yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır

2. Materyal ve Yöntem

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü) ($2n=4x=28$) E2 [19] çeşidine ait bitkiler tarla şartlarında yetiştirildi (**Şekil 1**).



Şekil 1. Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü) bitkisi.

Işık ve elektron mikroskobu çalışmaları için farklı gelişme evrelerine ait (Tablo 1) çiçek tomurcuğu ve çiçek örneklerinden çıkarılan dişi organlar 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 [20].

Elektron mikroskobu çalışmaları için örnekler önce %3'lük gluteraldehit ile daha sonra da %1'lik osmium tetraoksit ile tespit edildi. Dehidrasyon ve doyurma işlemlerinden sonra örnekler Epon 812 içine yerleştirilmiştir [21]. Yarı ince kesitler metilen mavisi ve toluidin blue ile boyanmıştır. İnce kesitler ise, uranil asetat ve kurşun sitrat [22] ile boyandıktan sonra JEOL CX-100 geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir.

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

Örneklerin alındığı evreler	Ovaryum boyu (µm)	İncelenen tohum taslağı sayısı (adet)
İleri tomurcuk evresi	550 - 750	128
Çiçek	750 - 950	109
Toplam		237

3. Bulgular ve Tartışma

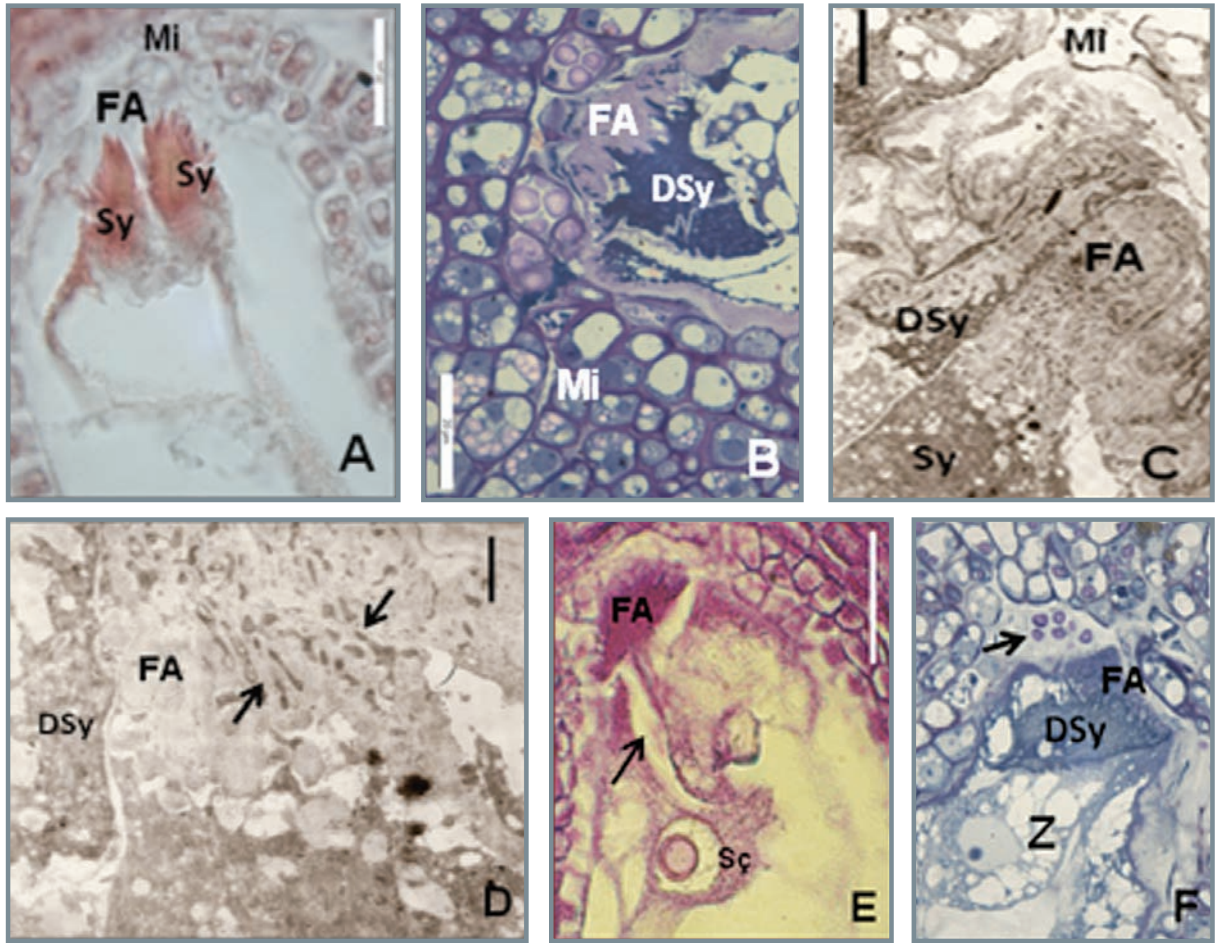
Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü)'de ovaryum boyu 550 µm ile 750 µm arasında olan tohum taslaklarında, meydana gelmiş olan olgun embriyo kesesinde, sinerjit hücrelerinin farklı bölgelerinde kalınlaşmış bir yapı halinde olan filiform aygıtının ışık mikroskobunda kep şeklinde olduğu ve koyu boyandığı gözlenmiştir. (Şekil 2A).

Ovaryum boyu 750-950 µm arasında olan tohum taslaklarında, elektron mikroskobu incelemelerinde mikropil tarafındaki integüment hücrelerinde nişasta içeren amiloplastların yoğun olduğu gözlenmiştir [23]. Bu evrede özellikle mikropile yakın integüment hücrelerinde, nişasta içeren amiloplastların bazı hücrelerde hücrenin içini tamamen doldurdukları gözlenmiştir (Şekil 2B).

Bir çok türde geçirmeli elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar filiform aygıtın çok kompleks bir organizasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur [4,3,7,24]. Filiform aygıtın temel bileşiğinin hemisellüloz olduğu gösterilmiştir [25]. Bazı türlerde ise, çizgili cihazın sellüloz, hemisellüloz, pektin, kallos ve proteinden oluştuğu bildirilmiştir [11, 14].

Geçirmeli elektron mikroskobunda yapılan incelemelerde, sitoplazmaya dönük filiform aygıt yüzeyinin çok sayıda düzensiz girinti çıkıntılar ve loblardan meydana geldiği ve yan çeperlerle bağlantılı olduğu gözlenmiştir (Şekil 2C ve D). Bazı kesitlerde filiform aygıtta sitoplazma adaları gözlenmiştir. Bunlar sitoplazmanın filiform aygıt içine doğru olan uzantılarıdır (Şekil 2D). Bazı örneklerde polen tüpünün çizgili cihazdan geçerek, sinerjit hücrelerinden birisine, dolayısıyla embriyo kesesine girdiği gözlenmiştir (Şekil 2E). [26].

Zigotun görüldüğü tohum taslaklarında, embriyo kesesinin mikropil tarafındaki integüment hücrelerinin bazısında çeperlerin eridiği ve nişasta tanelerinin serbest kaldığı saptanmıştır (Şekil 2F).

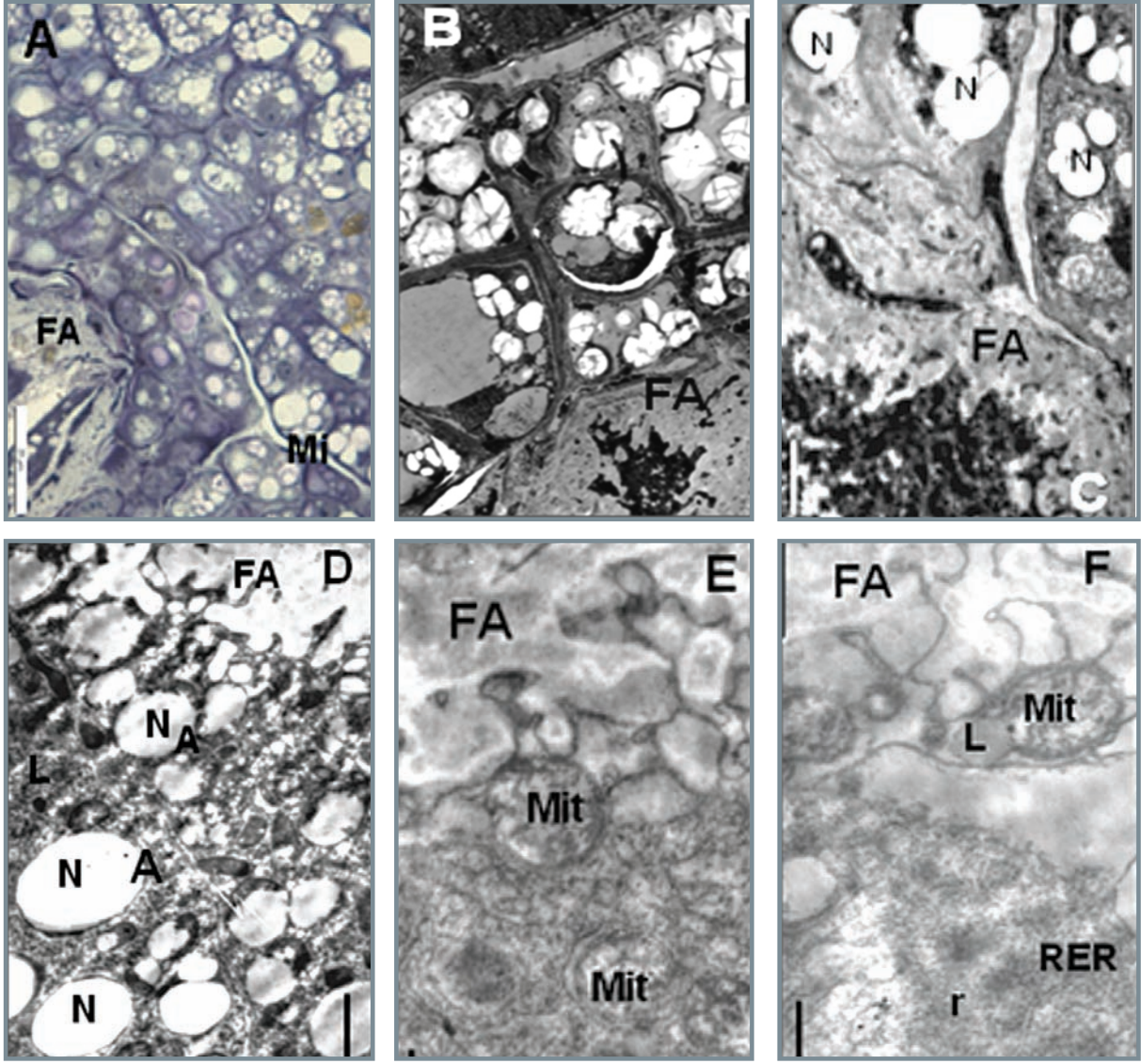


Şekil 2-A) Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü)'de olgun embriyo kesesinin mikropil kısmında sinerjit hücreleri üzerindeki filiform aygıt. Bar = 20 µm. B) Dejenere olan sinerjit ve filiform aygıtın yarı ince kesiti. Bar = 20 µm. C) Filiform aygıtın elektron mikrografi Bar = 2 µm. D) Çok sayıda düzensiz girinti çıkıntılar ve loblardan meydana gelen filiform aygıt ve sitoplazmanın filiform aygıt içine doğru olan uzantıları (oklar) Bar =2 µm. E) Polen tüpünün (ok) filiform aygıttan geçerek embriyo kesesine girişi. Bar = 20 µm. F) embriyo kesesinin mikropil tarafında integüment hücrelerinin erimesi ile serbest kalan nişasta taneleri (oklar) Bar =20 µm. Mikropil (Mi), Dejenere sinerjit (DSy), çizgili cihaz (=filiform apparatus) (FA), Sekonder çekirdek (Sç), Zigot (Z)

Mikropil tarafında embriyo kesesi çeperine yakın integüment hücrelerinde nişasta içeren amiloplastların yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 3A-C). Elektron mikroskobu incelemelerinde, nişasta taneleri elektronca şeffaf görülmektedir.

Mikropil tarafında sinerjit hücreleri üzerindeki filiform aygıtın bazı bölgelerde parmak şeklinde ince uzantılar meydana getirmesi ve mikropil tarafındaki integüment hücrelerinde çeperlerin eriyerek, nişasta tanelerinin serbest kalması muhtemelen besinlerin integümentlerden embriyo kesesine iletiildiği fikrini düşündürmektedir.

Sinerjit hücrelerinin mikropil yönünde özel iki membranlı kalınlaşmış bir yapı halinde görülen filiform aygıt elektronca şeffaf görünmektedir. Bu yapı yakınındaki sitoplazmada mitokondriler, ribozomlar, diktiyozomlar, ER kitleleri, lipid ve protein cisimcikleri, büyük nişasta taneleri içeren amiloplastlar ve veziküller fazla sayıdadır (Şekil 3D). Mitokondriler kısa kristal, oval veya yuvarlak şekillidir (Şekil 3E). Diktiyozomlar 4-6 sisternadan oluşur ve uçları vesiküllüdür. Çizgili cihaz yakınındaki sitoplazma ribozomlu ER bakımından zengindir (Şekil 3F). ER genellikle diğer organelleri çevreler. Ribozomlar ve lipid cisimcikleri bütün sitoplazmada mevcuttur.



Şekil 3A) Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü)'de mikropil tarafında embriyo kesesi çeperine yakın integüment hücreleri Bar=20µm. B) Filiform aygıtıya yakın integüment hücrelerinde bulunan nişastalı amiloplastlar Bar=1µm. C) B'deki elektron mikrografın büyütülmüş görüntüsü. Bar=1µm. D) Filiform aygıtı yakınındaki sitoplazmada bulunan organeller. Bar=2 µm. E) Kısa kristal mitokondriler Bar=1µm F) Düz endopazmik retikulum ve ribozomlar. Bar = 1µm. Filiform aygıt (Filiform apparatus=FA), amiloplast (A), Nişasta (N), lipid cisimcikleri (L), mitokondri (Mit), düz endopazmik retikulum (RER), ribozom (r).

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L'de, sinerjit çeperinin farklılaşması ile oluşan filiform aygıtın girintili çıkıntılı bir yapı halinde olması muhtemelen plazma yüzeyini arttırmak amacıyla olduğu bildirilmiştir [1]. Filiform aygıt çevresindeki büyük nişasta taneli plastidler ve lipid cisimleri bu yapının absorblayıcı olduğunu göstermektedir. ER'un uzun sisternaları filiform aygıt ile ilişkilidir ve plazma zarına paraleldir. Bunların absorblanmış materyalin naklinde kanal olarak iş gördükleri düşünülmektedir. Filiform aygıtıya bağlı sitoplazmada mitokondrilerin fazla sayıda olması ise solunum potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Mitokondrilerin plazma zarı ile olan sıkı bağlantısı ise bir çok bileşiklerin absorpsiyonu için gerekli olan enerjinin muhtemelen mitokondriler tarafından temin edildiğini düşündürmektedir. Bu nedenlerle tohum bağlama oranı düşük olan doğal tetraploid *Trifolium pratense* L (Elçi çayırüçgülü)'de çizgili cihazın döllenmeyi engelleyici bir oluşum göstermediği gibi polen tüpünün girişine ve dişi gametofitin beslenmesine yardımcı olduğu sonucuna varılabilir.

4. Kaynaklar

1. G. Algan, H.N. Bakar, The ultrastructure of mature embryo sac in the natural tetraploid of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66: 145-152. (1997).
2. P. Maheshwari, An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill, New York pp 453. (1950).
3. M. Ünal, Bitki (Angiosperm) Embriyolojisi. Marmara Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 11 (2004).
4. M.T.M. Willemse, J.L. van Went, The female gametophyte. In: Johri BM (ed) Embryology of angiosperms. Springer, Berlin, pp 159–196. (1984).
5. B.M. Johri, K.B. Ambegaokar, P.S. Srivastava, Comparative embryology of angiosperms, vols. 1, 2. Springer, Berlin. (1992).
6. L. Reiser, R.L. Fischer, The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5:1291-1301 (1993).
7. S.D. Russell, Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany* 57: 1093-1110 (1978).
8. S.G. Mansfield, L.G. Briarty, S. Erni, Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. 1. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany* 69: 447-460 (1990).
9. M.C. Webb, B.E.S. Gunning, Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*: Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton. *Sexual Plant Reproduction* 3: 244-256 (1990).
10. A.F. Soverna, B. Galati, P. Hoc, Study of ovule and megagametophyte development in four species of subtribe Phaseolinae (Leguminosae). *Acta Biologica Cracoviensia Ser. Bot.* 452: 63-73 (2003).
11. B.Q. Huang, S.D. Russell, Female germ unit: organization, isolation, and function. *International Review of Cytology* 140:233–292 (1992).
12. T. Higashiyama, The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of Plant Research* 115:149–160 (2002).
13. M.T.A. García, B.G. Galati, A.M. Anton, Development and ultrastructure of the megagametophyte in *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 142: 73–81 (2003).
14. M.R. Lovisolo, B.G., Galati, Ultrastructure and development of the megagametophyte in *Eleusine tristachya* (Lam.) Lam. (Poaceae). *Flora* 202: 293-301 (2007).
15. J.A. Punwani, G.N. Drews, Development and function of synergid cell. *Sexual Plant Reproduction* 21: 7-15 (2008).
16. S.R. Schulz, W.A. Jensen, Capsella embryogenesis the synergids before and after fertilization *American Journal of Botany* 55(5): 541-552 (1968),
17. M.R. Vijayaraghavan, W.A. Jensen, M.E. Ashton, Synergids of *Aquilegia formosa* their histochemistry and ultrastructure. *Phytomorphology* 22(2): 144-159 (1972).
18. W. Newcomb, The development of the embryo sac of sunflower, *Helianthus annuus* before fertilization *Canadian Journal of Botany* 51: 863-878 (1973)
19. Ş. Elçi, The utilization of genetic resource in fodder crop breeding, *Eucarpia Fodder Crop Section* 13-16 September, Aberystwyth UK. (1982).
20. G. Algan, Bitkisel Dokular için Mikroteknik. Fırat Üniversitesi Yayınları, Bot.No: 1 (1981).
21. J.H. Luft, Improvements in epoxy resin embedding methods. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9: 409-414 (1961).
22. J.G. Stempak, R.T., Ward, An improved staining method for electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 22: 697 (1964).
23. H.N. Büyükkartal, *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü-Fabaceae)' de integüment gelişimi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji* 2(1): 51-59. (2012).
24. S.D. Russell, The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1349-1359 (1993).
25. C.Y. Chao, A periodic acid-schiff's substance related to the growth of pollen tube into embryo sac in *Paspalum* ovules. *American Journal of Botany* 58: 649-654 (1971).
26. H.N. Bakar Büyükkartal, Ultrastructural changes of the egg apparatus associated with fertilisation of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Fabaceae). *Biological Research* 42: 25-30 (2009).