

Н.В. МАРКО, С.В. ШЕВЧЕНКО

Нікітський ботанічний сад — Національний науковий центр  
НААНУ

смт Нікіта, м. Ялта, Крим, 98648

*nataly-marko@rambler.ru*

## ЗАПЛІДНЕННЯ, ЕНДОСПЕРМО- ТА ЕМБРІОГЕНЕЗ У *ADONIS VERNALIS* L. (*RANUNCULACEAE*)

---

*Ключові слова:* *Adonis vernalis*, зигота, ендосперм, проембріо,  
недорозвинений зародок, Крим

*Adonis vernalis* L. (сем. *Ranunculaceae*) — декоративна і цінна лікарська рослина флори України, яка має статус виду, що охороняється [21]. Щоб з'ясувати причини малої чисельності *A. vernalis* у Криму, ми здійснюємо дослідження особливостей природного відновлення його ценопопуляцій, включаючи всі етапи репродуктивного процесу [8, 9, 31]. У результаті вивчення генезису чоловічих і жіночих генеративних структур *A. vernalis* нами встановлено, що у процесах їх формування спостерігаються відхилення (в чоловічій сфері — порушення під час мейозу у вигляді цитоміксису, викиду хромосом за межі метафазної пластинки, відставання при розходженні хромосом в анафазі I; у жіночій сфері — недорозвинення насінних зачатків), які певною мірою позначаються на кількості генеративних елементів, що утворюються згодом [8, 31].

Як відомо, нормальний перебіг процесів запліднення, ендоспермо- та ембріогенезу обумовлює формування повноцінних насінин. У літературі є достатньо інформації щодо ембріології однорічних видів роду *Adonis* L.: *A. autumnalis*, *A. aestivalis*, *A. chrysocyathus*, *A. flammea*, *A. annua* [19, 26—28, 32, 33], однак багаторічні види роду, зокрема *A. vernalis*, в ембріологічному аспекті вивчені ще недостатньо. Так, Є.Л. Кордюм дослідила й описала формування та особливості чоловічих і жіночих структур *A. vernalis* у зв'язку з вирішенням питань систематики і філогенії родини *Ranunculaceae*. Деякі дані з ембріології *A. vernalis* знаходимо також у працях Л.Д. Сфремової [4, 5].

У пропонованій статті представлені результати дослідження процесів запліднення, ендоспермо- та ембріогенезу і проростання насіння *A. vernalis*.

### Матеріали та методи досліджень

Матеріалом дослідження слугували особини ценопопуляції *A. vernalis* у передгірній зоні Криму, на схилах північної та південної експозицій горбів заввишки близько 200—300 м н. р. м., у с. Лозове Сімферопольського р-ну. Для приготування постійних препаратів використовували загальноприйняті методики

© Н.В. МАРКО, С.В. ШЕВЧЕНКО, 2012

[14]. Насінні зачатки і насіння різної величини фіксували сумішшю Карнуа (6:3:1) і фіксатором Чемберлена (90:5:5). Тривалість фіксації сумішшю Карнуа — 6 год., відтак об'єкти переносили у розчин із 70 % спирту. Після промивання та зневоднення фіксований матеріал просочували хлороформом (проміжна рідина) і парафіном за загальноприйнятими цитоембріологічними методиками [14, 18]. Зрізи виготовляли завтовшки 10—12 мкм за допомогою ротаційного мікротома марки МРТУ. Препарати фарбували кількома способами: гематоксиліном за Гейденгайном [3] із підфарбовуванням алціановим синім, тривалість фарбування — 1 год.; а також метиловим зеленим і піроніном із підфарбовуванням алціановим синім [14, 22, 23], тривалість фарбування для *A. vernalis* — 3—4 год. залежно від стадії розвитку. Знімки отримано під мікроскопом JENVAL фірми «Цейс» із використанням цифрового фотоапарата Canon A-80.

### Результати досліджень та їх обговорення

Наприкінці першої декади квітня, невдовзі після розкриття квітки *A. vernalis*, у зародкових мішках насінних зачатків відбуваються процеси запліднення (наведені фенологічні дати стосуються квіток на пагонах I порядку, для квіток на пагонах II порядку терміни зсуваються, відповідно до ритмів їхнього розвитку, на 5—7 діб). У цей час власні пиляки в квітках ще закриті і запліднення здійснюється пилком інших квіток. Іноді поодинокі зародкові мішки запліднюються перед розкриттям квітки в напіврозкритих пуп'янках завдовжки 17—18 мм.

Для *A. vernalis* характерна порогамія (рис. 1). Пилкова трубка містить ядро вегетативної клітини і два черв'якоподібні спермії.

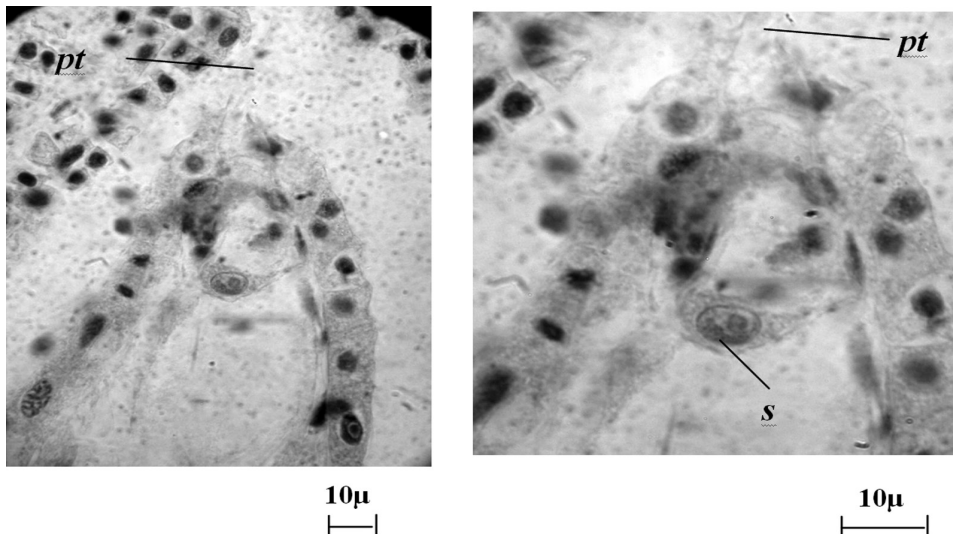


Рис. 1. Порогамія і сингамія у *Adonis vernalis* L. (pt — пилкова трубка, s — сингамія)  
 Fig. 1. Porogamy and syngamy in *Adonis vernalis* (pt — pollen tube, s — syngamy)

Пилкова трубка заходить до зародкового мішка, проростає через одну з синергід, виливаючи у неї свій вміст, спермії потрапляють у щілину між

яйцеклітиною і центральною клітиною зародкового мішка. У синергиді відбуваються зміни ядра і цитоплазми: ядро синергиди стискається, зменшуючись в об'ємі, а пізніше дегенерує (рис. 2). Згодом із синергиди один спермій прямує до яйцеклітини, інший — до центральної клітини, полярні ядра якої зливаються до запліднення. В однорічних представників роду *Adonis* спермій зливається спочатку з верхнім (мікропілярним) полярним ядром, відтак ядро, що утворилося, зливається з нижнім полярним ядром [27]. Сингамія (об'єднання гамет) у *A. vernalis* здійснюється за премітотичним типом (рис. 2, В).

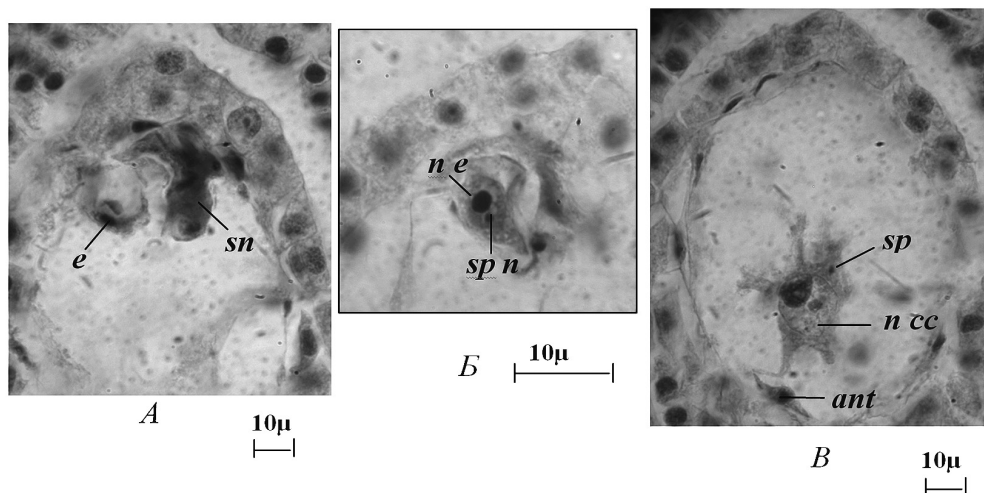


Рис. 2. Подвійне запліднення у *Adonis vernalis*: А — пилкова трубка входить до зародкового мішка через синергиду, видно спермії; Б — премітотичний тип злиття гамет; В — потрійне злиття (*ant* — антиподи, *sn* — синергиди, *sp* — спермії, *e* — яйцеклітина, *sp n* — ядро спермія, *n cc* — ядро центральної клітини, *n e* — ядро яйцеклітини)

Fig. 2. Double fertilization in *Adonis vernalis*: А — pollen tube comes into embryo sac through a synergid, spermia are visible; Б — premitotic type of gamete fusion; В — triple fusion (*ant* — antipodes, *sn* — synergid, *sp* — sperms, *e* — egg, *sp n* — spermium nucleus of, *n cc* — central cell nucleus, *n e* — egg nucleus)

Злиття спермія з ядром центральної клітини відбувається раніше, ніж сингамія, як і в інших видів роду *Adonis* [26—28]. Поділ первинного ядра ендосперму також настає набагато раніше за поділ зиготи і не супроводжується цитокінезом, дочірні ядра розходяться до протилежних полюсів і вільно розташовуються в тяжі цитоплазми. Ендосперм *A. vernalis* розвивається за нуклеарним типом (рис. 3).

За нашими даними, зигота починає ділитися на стадії багатоядерного ендосперму, що також узгоджується з відомостями інших дослідників. Згідно з інформацією Бхандарі [27], в однорічних видів роду *Adonis* перший поділ зиготи відбувається на стадії 64-ядерного ендосперму. Є.Л. Кордюм [7] спостерігала перший поділ зиготи у багатоядерному ендоспермі в зародкових мішках у деяких представників родини *Ranunculaceae*, зокрема в *A. vernalis*.

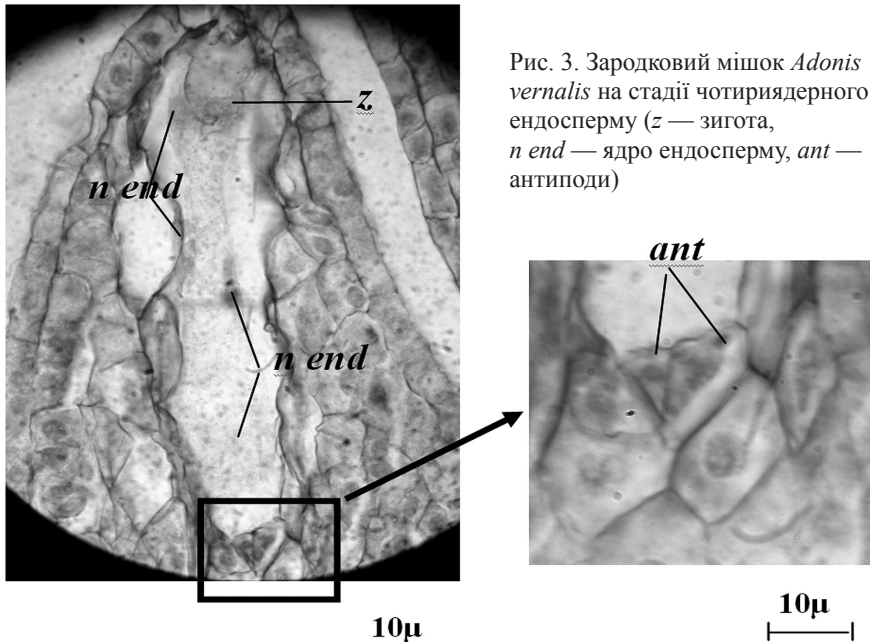


Рис. 3. Зародковий мішок *Adonis vernalis* на стадії чотириядерного ендосперму (*z* — зигота, *n end* — ядро ендосперму, *ant* — антиподи)

Fig. 3. *Adonis vernalis* embryo sac at the stage of four nuclear endosperm (*z* — zygote, *n end* — endosperm nucleus, *ant* — antipodes)

Після першого поперечного поділу зиготи відбувається поперечний поділ її апікальної клітини (*ca*) з утворенням верхньої (*cc*) і нижньої (*cd*) клітин (рис. 4). Згодом поперечно ділиться і базальна клітина (*cb*), утворюються нижня (*ci*) і середня (*m*) клітини, в результаті чого формується лінійна тетрада проембрію (рис. 4). Проте в однорічних видів цього роду, наприклад в *A. annua*, першою ділиться базальна клітина (*cb*), формуючи клітини *ci* та *m*, апікальна ж клітина (*ca*) ділиться вертикально [27]. Стадію лінійної тетради проембрію у *A. vernalis* ми спостерігали наприкінці квітня, коли в квітці опадали чашечка і віночок.

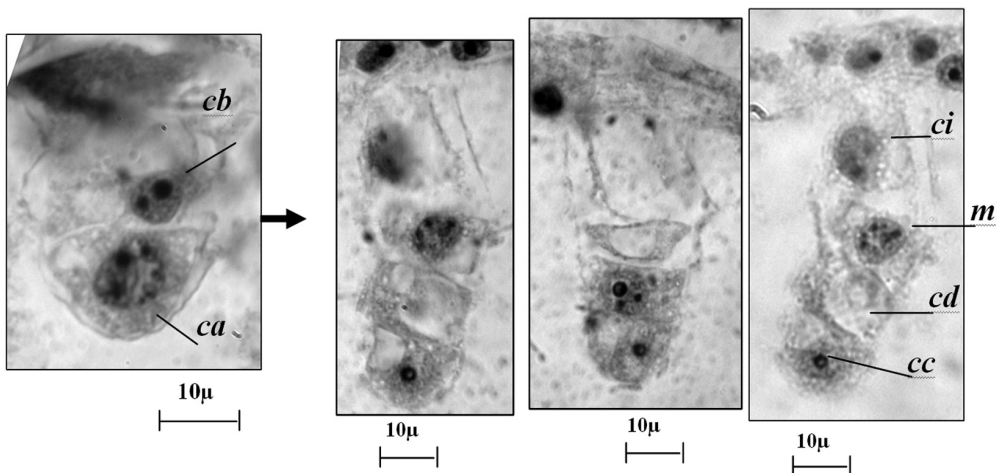


Рис. 4. Лінійна тетрада проембрію (позначення в тексті)  
Fig. 4. Linear tetrad of a proembryo (explanation in the text)

Перший вертикальний поділ клітин проембрію відбувається на початкових етапах дозрівання плодів у супліддях завдовжки 12 мм. Спочатку вертикально діляться похідні апікальної клітини: верхні (*cc*), а потім — нижні (*cd*). Клітини, що утворюються (*q* і *q'*), формують квадранти, розташовані двома ярусами. На цій стадії ще видно залишки синергід (рис. 5).

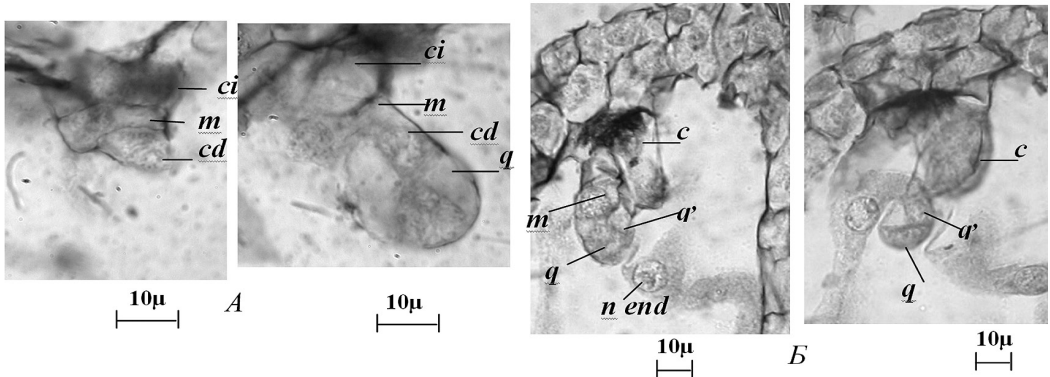


Рис. 5. Закладання вертикальних перетинки у проембрію *Adonis vernalis*. А, Б — послідовні етапи (позначення в тексті)

Fig. 5. Formation of vertical walls in *Adonis vernalis* proembryo. А, Б — successive stages (explanation in the text)

Після закладання перших вертикальних перетинки у похідних апікальної клітини (*cc* і *cd*) відбувається другий вертикальний поділ у площині, під прямим кутом до площини першого вертикального поділу (рис. 6). У результаті цього в обох ярусах похідних апікальної клітини (*cc* та *cd*) утворюються по чотири клітини. Таким чином, на апікальному кінці проембрію формується октант: вісім клітин, які розташовуються двома ярусами (поверхами) — *l* і *l'* (рис. 6). Похідна базальної клітини, середня клітина (*m*), ділиться поперечно, а потім поздовжньо, продукуючи клітини *n* та *n'* (рис. 6).

Слід відзначити, що з формуванням октантів починається перехід ендосперму з ценоцитної у клітинну стадію. У пристінній цитоплазмі ендосперму між ядрами з'являються клітинні перетинки (рис. 7). Закладання клітинних перетинки відбувається від периферії до центру та супроводжується активними, переважно синхронними, поділами його ядер. У зв'язку з цим периферичні клітини ендосперму мають правильну прямокутну форму (рис. 8).

На час формування глобулярного зародка весь ендосперм стає клітинним (рис. 8). Поперечні поділи похідних базальної клітини (*ci* і *m*) зумовлюють утворення суспензора — *ss* (рис. 8). Таким чином, згідно з типологією D.A. Johansen [30], ембріогенез у *A. vernalis* відбувається за Solanad-типом, тобто основні частини зародка утворюються з клітини *ca*, підвісок і гіпофіз — із клітини *cb*.

У другій декаді травня, незадовго до обсіпання плодів, у супліддях завдовжки 18—20 мм, у шарі товстого ендосперму, в мікропілярній частині розташований глобулярний зародок, який має три-, чотириклітинний підвісок і шар ембріодерми (рис. 8).

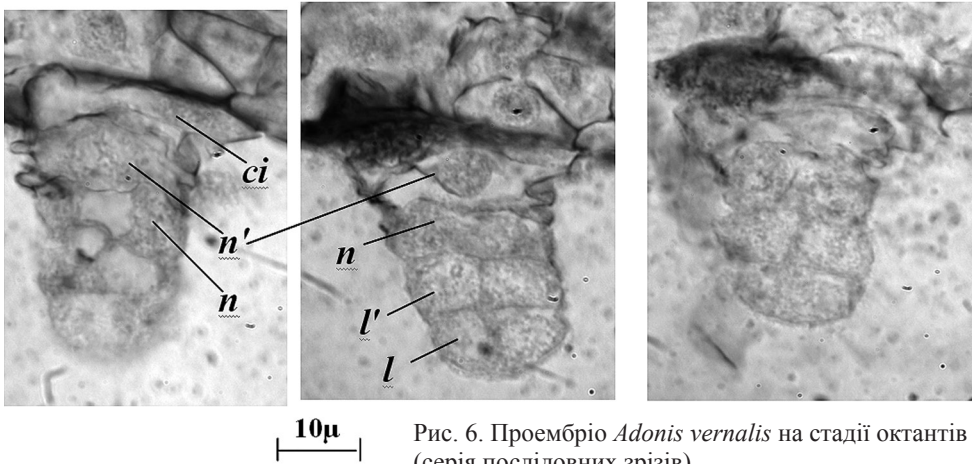


Рис. 6. Проємбріо *Adonis vernalis* на стадії октантів (серія послідовних зрізів)

Fig. 6. *Adonis vernalis* proembryo at the stage of octants (series of successive sections)

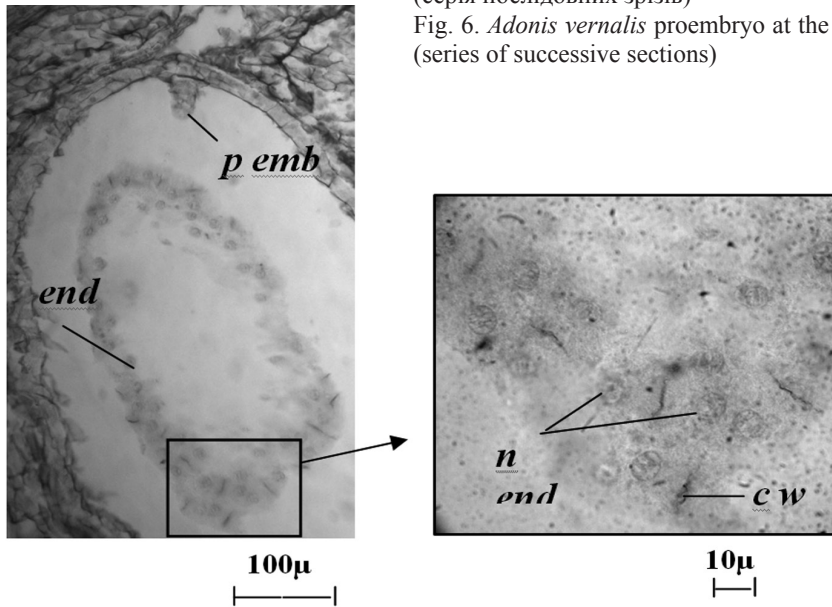


Рис. 7. Закладання клітинних перетинки в ендоспермі *Adonis vernalis* (*p emb* — проємбріо, *end* — ендосперм, *n end* — ядра ендосперму, *c w* — клітинна перетинка)

Fig. 7. Formation of cell walls in endosperm of *Adonis vernalis* (*p emb* — proembryo, *end* — endosperm, *n end* — endosperm nucleus, *c w* — cellular wall)

Наприкінці травня, в період дисемінації, у насінні міститься один слабодиференційований маленький зародок, серце- або грушоподібної форми, і рясний товстий однорідний ендосперм. Відношення довжини зародка до довжини ендосперму в насінні *A. vernalis* становить 1 : 10 (10 — 15 %).

Аналіз насіння, яке зберігалось в лабораторії (за температури 18—20° С і відносній вологості 45 %), показав, що зародок у *A. vernalis* дорозвивається у внутрішньонасінний період упродовж трьох років (рис. 9). Цю особливість для видів *Adonis* секції *Consolligo* також зазначала З.Е. Шлангена [24]. На третій

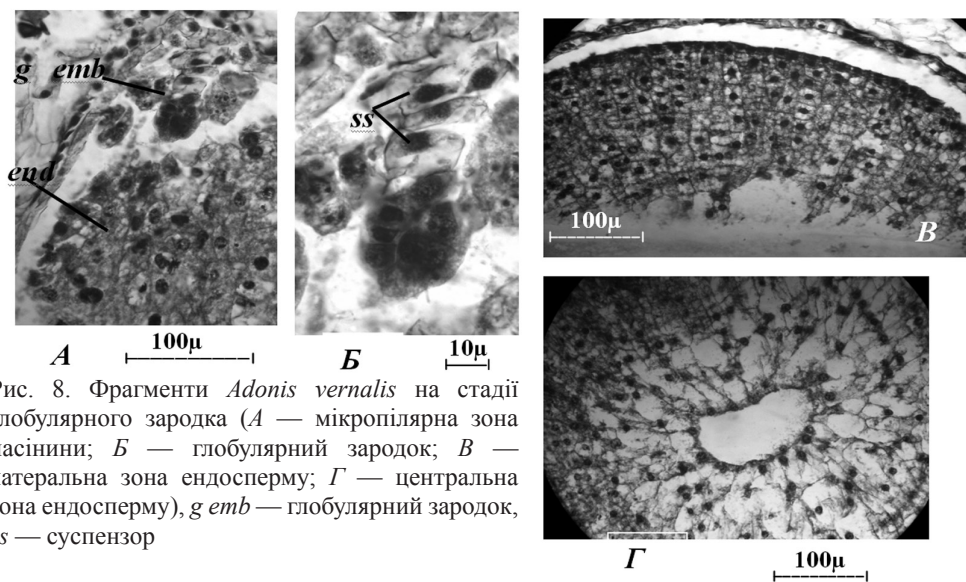


Рис. 8. Фрагменти *Adonis vernalis* на стадії глобулярного зародка (А — мікропілярна зона насінини; Б — глобулярний зародок; В — латеральна зона ендосперму; Г — центральна зона ендосперму), *g emb* — глобулярний зародок, *ss* — суспензор

Fig. 8. Fragments of *Adonis vernalis* seed at the stage of globular embryo (А — micropylar zone a seed; Б — globular proembryo; В — endosperm lateral zone; Г — endosperm central zone) *g emb* — globular embryo, *ss* — suspensor

рік зародок *A. vernalis* диференціює на дві сім'ядолі, між якими розташовані меристематичний горбик (примордій бруньки) й апекс кореня, покритий кореневим чошликом (рис. 9).

У лабораторних умовах насіння *A. vernalis* не проростає. За літературними даними, в умовах культури його схожість низька і варіює від 1,0—3,3 % до 16 % [1, 6, 10—12, 24], хоча є дані, коли вона сягала 40—50 % [16, 20], 64 % [2], 72 % [25], 80—83 % [13, 15, 29]. На нашу думку, низька схожість насіння спричинена

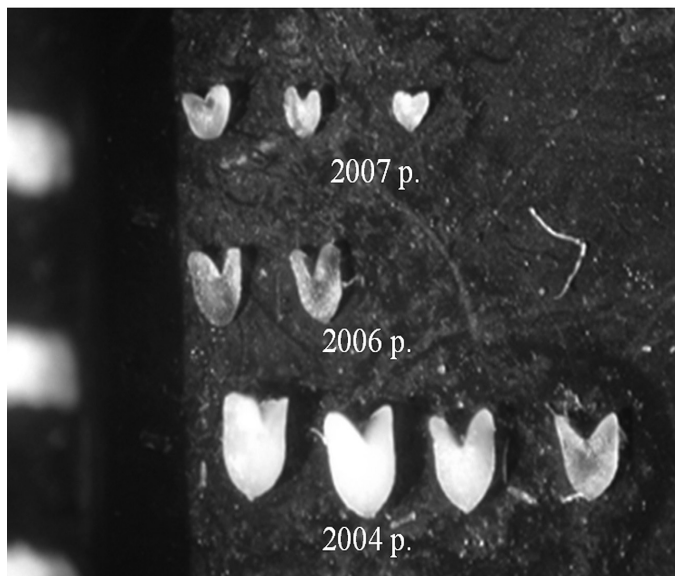


Рис. 9. Зародки *Adonis vernalis* із насіння після трьох (2004) і двох років збереження (2006), а також свіжозібраного (2007).

Fig. 9. *Adonis vernalis* embryos from seeds kept for 3 years (since 2004), seeds kept for 2 years (since 2006), and recent (2007).

недорозвиненістю зародка *A. vernalis*, оскільки в насінні він перебуває на стадії сердечка. Окрім того, механізмами інгібування (пригнічення) обумовлена різна швидкість проростання насіння.

Недорозвиненість зародка в опалих сім'янках позначається на кількості проростків, цим і пояснюється слабке природне відновлення виду. Реальна насіннева продуктивність становить 37—41 %, кількість проростків на м<sup>2</sup> незначна (0—4). Ми також з'ясували, що для генеративних особин *A. vernalis* характерне розростання кореневища з подальшою бічною партикуляцією [9, 17]. Це можна віднести до вегетативного розмноження в широкому сенсі — як збільшення кількості генеративних пагонів на одиницю площі, а відповідно — і насіння. Відтворення і самопідтримання ценопопуляцій *A. vernalis* забезпечується переважно насіннєвим розмноженням та боковою партикуляцією, що і зумовлює його стратегію виживання.

## Висновки

Отже, у результаті дослідження особливостей запліднення, ендоспермо- та ембріогенезу *A. vernalis* (у кримських ценопопуляціях) ми не виявили жодних аномалій чи порушень цих процесів, і рослини виду за наявності запилення здатні формувати нормальне насіння. Характер орієнтації перетинок і послідовність клітинних поділів проембрію засвідчують, що ембріогенез *A. vernalis* відбувається за Solanad-типом, а розвиток ендосперму — за нуклеарним типом. Насіння *A. vernalis* формується порівняно швидко — протягом 24—30 днів. При цьому насіння в опалому плоді *A. vernalis* містить добре розвинений ендосперм і маленький серцеподібний зародок, який потребує певного періоду для подальшого внутрішньонасінневого росту і диференціювання. Недорозвиненість зародка під час дисемінації насіння *A. vernalis* є однією з основних причин утрудненого і тривалого його проростання в природних умовах. Очевидно, цим і зумовлене слабке насіннєве відновлення виду.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксельрод Д.М. Биологические особенности и приёмы возделывания горлицы весеннего / Дикорастущие и интродуцируемые растения в Башкирии : сб. науч. работ. — Уфа, 1961. — С. 74—86.
2. Животенко Л.Ф. Состояние ресурсов адониса весеннего в предгорном Крыму / IV Міжнар. конф. з мед. ботаніки. — К., 1997. — С. 90—91.
3. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. — 2000. — **85**, № 6. — С. 168—170.
4. Ефремова Л.Д. К эмбриологии некоторых лекарственных и ядовитых растений семейства Лютиковых в связи с их биологией развития / Всесоюз. симпозиум по эмбриол. растений. — Киев: Наук. думка, 1969. — С. 286.
5. Ефремова Л.Д. Состояние репродуктивных органов у *Adonis vernalis* L. на различных этапах генеративного развития // Растительные ресурсы. — 1971. — 7, вып. 2. — С. 200—204.
6. Ивашин Д.С. До біології і екології горлиці весняного (*Adonis vernalis* L.) // Укр. ботан. журн. — 1962. — **19**, № 4. — С. 84—90.



7. Кордюм Е.Л. Сравнительно-эмбриологическое исследование семейства Лютиковых / Е.Л. Кордюм. Морфогенез растений. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1961. — Ч. 2. — С. 473—477.
8. Марко Н.В. Женская генеративная сфера *Adonis vernalis* L. (*Ranunculaceae*) // Бюлл. Никит. ботан. сада.— 2005. — Вып. 91.— С. 82—86.
9. Марко Н.В. О естественном возобновлении *Adonis vernalis* L. и *Paeonia tenuifolia* L. в Крыму / Н.В. Марко, С.В. Шевченко // Тр. Никит. ботан. сада.— 2005. — Вып. 125. — С. 88—98.
10. Мельник В.І., Парубок М.І. Горицвіт весняний (*Adonis vernalis* L.) в Україні / — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 163 с.
11. Муковкина З.П. К вопросу о всхожести семян горицвета весеннего / Биол. основы семеноведения и семеноводства интродуцентов. — Новосибирск, 1974. — С. 212—214.
12. Муковкина З.П., Киричев А.Н., Карташова Л.М. Ранневесенние дикорастущие декоративные растения в Воронежском ботаническом саду // Бюлл. Глав. ботан. сада. — 1985. — Вып. 136. — С. 29—32.
13. Николаева М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М.Г. Николаева, М.В. Разумова, В.Н. Владкова. — Л.: Наука, 1985. — 347 с.
14. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
15. Пошкурлат А.П. Большой жизненный цикл горицвета весеннего // Растительные ресурсы. — 1975. — 11, № 4. — С. 483—492.
16. Пошкурлат А.П. Семенное размножение горицвета весеннего (*Adonis vernalis* L.) / Науч. докл. высш. школы : биол. науки. — 1969. — № 7. — С. 54—59.
17. Рекомендации по изучению и оптимизации естественного возобновления редких видов флоры Крыма / С.В. Шевченко, Т.Н. Кузьмина, Н.В. Марко, А.Д. Ярославцева, А.И. Ругузова, А.Н. Зотов. — Ялта: НБС—ННЦ, 2011. — 80 с.
18. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Пер. с нем. В.Я. Александрова, З.И. Крюкова. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1954. — 718 с.
19. Соколовская Т.Б. Семейство *Ranunculaceae* / Т.Б. Соколовская. Сравнит. эмбриология цветковых растений: *Winteraceae—Juglandaceae*. — Л.: Наука, 1981. — С. 133—139.
20. Флоря В.Н., Крецу Л.Г. Биологическая характеристика горицветов Молдавии при интродукции // Растительные ресурсы. — 1981. — 17, № 5. — С. 381—385.
21. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — 900 с.
22. Шевченко С.В., Ругузов И.А., Ефремова Л.М. Методика окраски постоянных препаратов метиловым зелёным и пиронином // Бюлл. Никит. ботан. сада.— 1986. — Вып. 66. — С. 99—101.
23. Шевченко С.В., Чеботарь А.А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Тр. Никит. ботан. сада : цитолого-эмбриол. исслед. высш. раст. — 1992. — Т. 113. — С. 52—61.
24. Шлангена З.Е. Хромосомные числа некоторых видов рода *Adonis* L. СССР (*Ranunculaceae*) // Ботан. журн. — 1979. — 61, № 11. — С. 1603—1608.
25. Юдін С.І. Біологічні особливості насінневого розмноження *Adonis vernalis* L. // Інтродукція рослин. — 2002. — № 3—4. — С. 63—67.
26. Bhandari N.N. Studies in the family *Ranunculaceae*. III. Development of the female gametophyte in *Adonis annua* L. // Phytomorph. — 1962. — 12 (1). — P. 70—74.
27. Bhandari N.N. Studies in the family *Ranunculaceae*. IX. Embryology of *Adonis* Dill ex Linn // Phytomorph. — 1966. — 16 (4). — P. 578—587.

28. Bhandari N.N. Studies in the family *Ranunculaceae*. V. The female gametophyte of *Adonis aestivalis* L. — a reinvestigation // *Phytomorph.* — 1963. — **13** (3). — P. 317—320.
29. Gawłowska J. Ochrona naturalnych zasobów a możliwości uprawy młka wiosennego *Adonis vernalis* L. // *Ochrona Przyrody.* — 1958. — R. 25. — P. 111—140.
30. Johansen D.A. *Plant Embryology.* — Waltham, MA : Chronica Botanica, 1950. — 305 p.
31. Marco N.V. Peculiarities of *Adonis vernalis* L. (family *Ranunculaceae*) generative structure development // *Інновац. напрямки наук. діяльності молодих вчених в галузі рослинництва: збірн. тез III-ї Міжнар. наук. конф. молодих вчених, присв. 40-річчю утворення Ради молодих вчених в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва (Харків, 20—22 червня 2006 р.).* — Харків, 2006. — С. 105—106.
32. Soueges R. Development de l'ovule du sac embryonnaire chez les *Adonis* // *Anatom. Anzeiger.* — 1912. — B. **49** (1). — S. 209—240.
33. Soueges R. Recherches sur l'embryogenie des *Renonculacees-Anemonees*. Genre *Adonis* // *Bull. Soc. Bot. France.* — 1912. — **59**. — P. 474—482, 545—550.

Рекомендує до друку

Надійшла 16.07.2011 р.

Є.Л. Кордюм

*Н.В. Марко, С.В. Шевченко*

Никитский ботанический сад — Национальный научный центр НААНУ, г. Ялта

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ, ЭНДОСПЕРМО- И ЭМБРИОГЕНЕЗ У *ADONIS VERNALIS* L. (*RANUNCULACEAE*)

Представлены результаты исследования отдельных этапов репродуктивного процесса редкого вида *Adonis vernalis* L., который имеет охранный статус. Установлены особенности оплодотворения, эндоспермогенеза и развития зародыша, приведены календарные сроки их протекания у данного вида в условиях Крыма. Работа иллюстрирована микрофотографиями.

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* *Adonis vernalis*, зигота, эндосперм, проэмбрио, недоразвитый зародыш, Крым.

*N.V. Marko, S.V. Shevchenko*

Nikita Botanical Garden — National Scientific Center, Yalta

FERTILIZATION, ENDOSPERM- AND EMBRYOGENESIS IN *ADONIS VERNALIS* L. (*RANUNCULACEAE*)

Results of the research on certain stages of reproductive process in a rare species, *Adonis vernalis* L., are presented. Some peculiarities of lobule fertilization, endosperm and embryo development are reported. Calendar terms for these processes in Crimea are provided. The article is illustrated by microphotographs.

*Key words:* *Adonis vernalis*, zygote, endosperm, proembryo, underdeveloped embryo, Crimea.