

Глава 4.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 635.9:581.5+58.085

doi: 10.31360/2225-3068-2020-72-86-93

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*
OSMUNDA REGALIS L. INTRODUCING *OSMUNDA*
REGALIS L. *IN VITRO***

Маляровская В. И., Рахмангулов Р. С., Конинская Н. Г.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru*

В статье приведены результаты изучения этапа введения исчезающего, редкого папоротника *Osmunda regalis* L. в стерильную культуру. Установлено, что наиболее оптимальными стерилизующими веществами для введения в культуру спорангиев *O. regalis* оказались 2%-ная перекись водорода в экспозиции 20 минут (жизнеспособных спор 54,1 %) и 5%-ный гипохлорит натрия в экспозиции 20 минут (жизнеспособных спор 48,4 %). Выявлено, что наилучшая питательная среда для микроразмножения гаметофитов папоротника с содержанием ½ состава микро и макросолей по прописи Мурасиге и Скуга без нитрата аммония и витаминов.

Ключевые слова: *Osmunda regalis*, папоротник, культура *in vitro*, гаметофит, стерилизация, питательные среды.

Западно-Кавказский биосферный регион богат уникальной и разнообразной флорой. Поэтому становится очевидной необходимость сохранения всего этого многообразия экосистем, насыщенных реликтовыми и эндемичными таксонами, подавляющее большинство которых относится к категориям «редкие» и «исчезающие» и внесены в Красные книги Краснодарского края и России [11].

Исследования по сохранению и размножению редких, исчезающих видов природной флоры Западного Кавказа методами биотехнологии во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур (ВНИИЦиСК, г. Сочи) проводятся уже на протяжении девяти лет. За этот период разработаны методы клонального размножения колокольчика твёрдолистного, лилии кавказской, введены в культуру некоторые другие виды [3–6, 8–10].

Среди видов, находящихся в критическом состоянии, многолетний папоротник *Osmunda regalis* L. Бореальный, евразийский, дизъюнктивный, третичнореликтовый, спорадично распространённый вид с

ограниченным числом мест произрастания, сокращающейся численностью и находящийся под угрозой исчезновения. В Красной книге отнесён к категории «Находящийся под угрозой исчезновения» [7, 14].

Единственным в России местом произрастания чистюста величавого, или осмунды королевской (*Osmunda regalis* L.) являлись болотистые ольховые леса Имеретинской низменности на территории современного Адлерского района г. Сочи. К середине XX века вид здесь исчез полностью [1]. В 1987 г. из зоны застройки в Пицунде было пересажено 267 экземпляров *O. regalis* на территорию Сочинского национального парка (СНП) и у границ Кавказского заповедника (КГЗ) [12]. Места реинтродукции были заранее подобраны по визуальному сходству с участком-донором по характеру растительности (заболоченные ольшаники) и с идентичным гидрохимическим режимом водоёмов. Однако катастрофическое падение численности вида в последние годы в местах произрастания в данном регионе РФ вновь поставило его под угрозу полного исчезновения. По данным учёных сочинского национального парка к 2016 г. из 267 экземпляров *O. regalis*, произраставших на территории парка, осталось только 21 растение [13]. Поэтому сохранение и размножение этого исчезающего вида методами биотехнологии является актуальной задачей.

В связи с этим **целью исследований** было изучение этапа введения в культуру *in vitro* *Osmunda regalis* L.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены на базе отдела биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур в 2018–2019 гг. Методика клонального микроразмножения основана на общепринятых классических приёмах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [2]. Объектами исследований были спорангии *Osmunda regalis* L.

На этапе введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов использовали спорангии *Osmunda regalis* L. Стерилизация спорангиев осуществлялась посредством их промывания в растворах стерилизующих агентов и стерильной воды. В качестве стерилизующих агентов использовали растворы «Доместоса», «Велтолена» и перекиси водорода. Стерилизацию проводили одноступенчатым способом.

Контроль – стерильная дистиллированная вода;

В-1. – «Доместос» в концентрации 5%-ной в течение 5 минут;

В-2. – «Велтолен» 0,1%-ный в течение 10 минут;

В-3. – Перекись водорода 2%-ная в течение 10 минут. После стерилизации спорангии трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Стерильные спорангии помещали на поверхность питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга (МС) (1962) [21]. Стерильную дистиллированную воду (1–2 мл) добавляли в пробирку для стимуляции прорастания спор. Культивирование проводили при освещении белыми люминесцентными лампами (3 000 лк), температуре $+23 \pm 1$ °С и фото-периоде 16/8 часов. В опыте по изучению размножения гаметофитов в зависимости от минерального состава питательной среды использованы следующие варианты:

- МС (контроль);
- $\frac{1}{2}$ МС (без NH_4NO_3 и витаминов);
- $\frac{1}{4}$ МС (без NH_4NO_3 и витаминов);
- $\frac{1}{8}$ МС (NH_4NO_3 и витамины).

Развитие спор наблюдали под микроскопом «Биомед-6».

Результаты и обсуждение. В эксперименте по изучению типов стерилизующих агентов, их концентраций и времени экспозиции для стерилизации спорангиев *Osmunda regalis*, установлено, что лучшими вариантами стерилизации эксплантов были 2%-ная перекись водорода в экспозиции 20 минут (54,1 %) и 5%-ный гипохлорит натрия в экспозиции 25 минут (48,4 %), разница между вариантами не существенна (рис. 1).

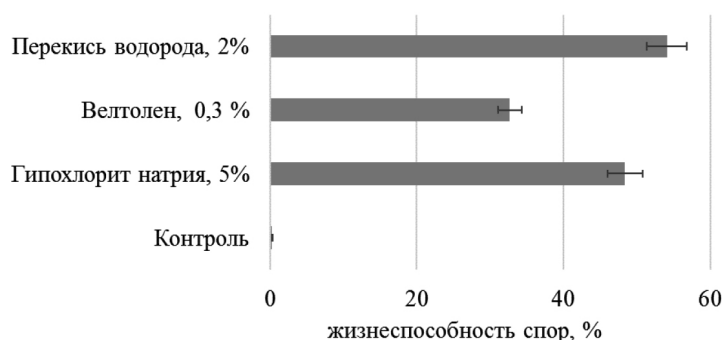
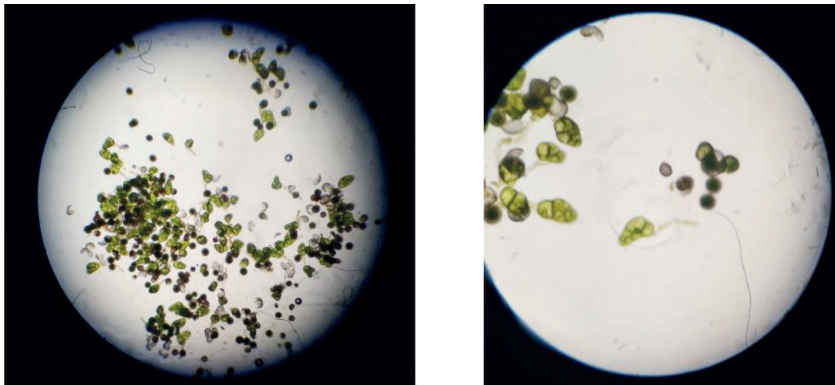


Рис. 1. Влияние стерилизующих агентов на выход жизнеспособных эксплантов *Osmunda regalis*, %

Прорастание спор *O. regalis* на питательной среде МС, наблюдали через 3 недели после введения их в стерильную культуру (рис. 2).

Через 7 недель культивирования спорангиев *O. regalis* было отмечено образование многоклеточных гаметофитов (рис. 3).

Образование кластеров гаметофитов наблюдали через 16 недель от начала культивирования спор (рис. 4). Гаметофиты папоротника были большими, удлинёнными и продуцировали множественные архегонии и антеридии.



а

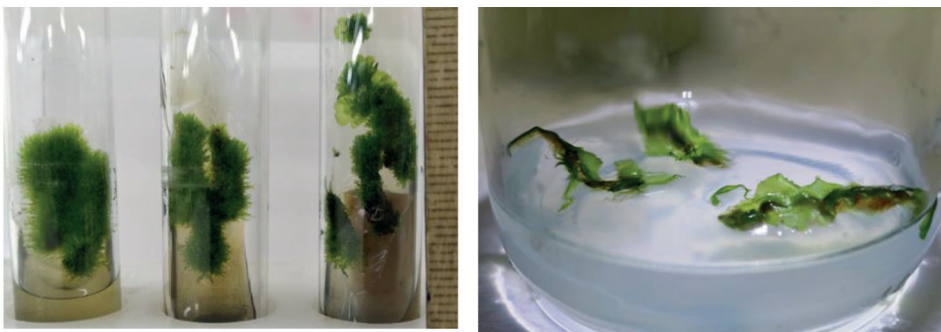
б

Рис. 2. Прорастание спор *Osmunda regalis*,
через 3 недели культивирования на питательной среде МС –
а, б – многоклеточная спора с ризоидом



Рис. 3.

Многоклеточные гаметофиты
Osmunda regalis,
через 7 недель культивирования
на питательной среде МС
(увелич. $40 \times 0,65$)



а

б

Рис. 4. Развитие спор *Osmunda regalis*:
а – кластеры гаметофитов на первичной среде МС;
б – удлинённые гаметофиты

Кластеры гаметофитов, полученные из спор в эксперименте, использовали как исходный материал, для изучения влияния состава минеральной основы питательной среды на размножение гаметофитов. Так, снижение концентрации минеральных солей до 1/8 МС в питательной среде привело к снижению образования гаметофитов (различия с контролем не существенны, $НСР_{0,5} = 3,4$) (рис. 5).

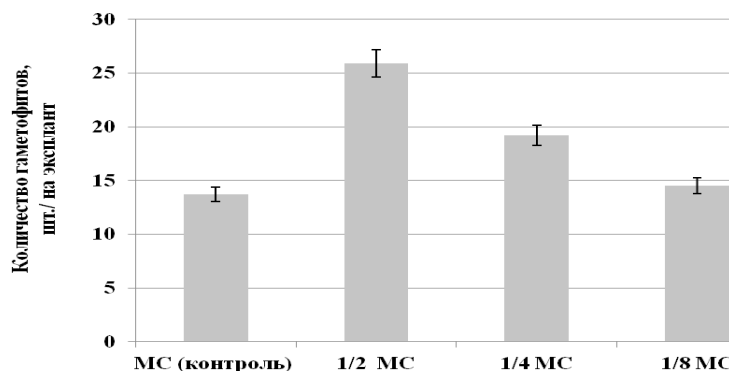


Рис. 5. Влияние концентраций минеральных солей на количество образовавшихся гаметофитов, шт./экплант

Есть предположение, что солевое голодание может тормозить процесс пролиферации гаметофита *O. regalis*. Fernandez H. с соавторами (1997) первые установили ингибирующее действие радикала аммония на рост и развитие гаметофитов папоротника [18]. Ими показано, что максимальная пролиферация гаметофитов была получена на МС без нитратов и витаминов [18]. Наши результаты не противоречат данным этих авторов. Наибольшее образование гаметофитов (25,9 шт./экплант) нами отмечено также на питательной среде, не содержащей нитрата аммония (NH_4NO_3) и витаминов с 1/2 минеральных солей по прописи МС. Некоторыми авторами установлено, что для многих видов папоротников, размножающихся в условиях *in vitro*, для увеличения количества гаметофитов необходимо дополнять питательные среды экзогенными регуляторами роста [15–17, 22, 23]. В нашем эксперименте эффективное размножение гаметофитов *O. regalis* проходило в отсутствии экзогенной гормональной стимуляции, что согласуется с данными других исследователей [19, 20, 24].

Таким образом, безгормональная и эффективная система размножения гаметофитов *O. regalis in vitro* может быть полезна в дальнейших исследованиях для массового получения спорофитов папоротника.

Заключение. Наиболее оптимальными стерилизующими веществами для введения в культуру *in vitro* спор *Osmunda regalis* были

2%-ная перекись водорода в экспозиции 20 минут (54,1 %) и 5%-ный гипохлорит натрия в экспозиции 20 минут (48,4 %). Получены гаметофиты редкого папоротника *O. regalis* в культуре *in vitro* с использованием спор в качестве эксплантов, которые будут использованы в дальнейших экспериментах по изучению влияния регуляторов роста на стадию развития спорофитов.

Библиографический список

1. Аскеров А.М. Редкие папоротники Кавказа и их охрана // Бот. журнал. – 1983. – Т. 68. – № 6. – С. 835-841.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 158 с.
3. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 49-58. – ISSN 0131-6397.
4. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Губаз С.Л. Создание и поддержание коллекции субтропических плодовых, цветочно-декоративных культур, редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2015. – Т. XXXIII. – С. 99-103. – ISSN 2073-4948.
5. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Самарина Л.С. Введение в культуру *in vitro* подснежника Воронова // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2017. – Вып. 61. – С. 167-173. – ISSN 2225-3068.
6. Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Маляровская В.И. Микроразмножение синеголовника приморского (*Eryngium maritimum* L.) в культуре *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2014. – Вып. 50. – С. 196-203. – ISSN 2225-3068.
7. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы / отв. ред. С.А. Литвинская. – Изд. 2-е. — Краснодар: Дизайн Бюро, 2007. – 639 с. – ISBN 978-5-91111-006-2.
8. Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caucasicum* в условиях культуры *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. Краснодар, – 2013. – № 94 – С. 1016-1026. – ISSN 1990-4665.
9. Соколов Р.Н, Коломиец Т.М., Маляровская В.И. Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа Политематический научный журнал КубГАУ, Краснодар, – 2013. – № 10(094) – IDA [articleID] 0941310013.
10. Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования редких видов растений Западного Кавказа: *Lilium caucasicum* Miscz. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancretium maritimum* L. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 103. – С. 619-631. – eISSN 1990-4665.
11. Тимухин И.Н. Инвентаризация основных таксономических групп и сообществ, зоологические исследования Сочинского национального парка – первые итоги первого в России национального парка / под ред. Б.С. Туниева. – М.: Престиж, 2006. – Вып. 2. – С. 150.
12. Тимухин И.Н. Результаты реинтродукции папоротника чистоуста величавого (*Osmunda regalis*) в России // Горные растительные ресурсы: теория и прогноз освоения и воспроизводства: материалы Кавказского симпозиума. – Махачкала, Дагестанский научный центр РАН, 1999. – С. 44-46.

13. Тимухин И.Н., Туниев Б.С. Современное состояние популяций *Osmunda regalis* (*Osmundaceae*) в России // Труды Дагестанского отделения Русского ботанического общества. Махачкала: АЛЕФ (ИП Овчинников М.А.), 2017. – Вып. 5. – С. 60-65.
14. Тимухин И.Н., Туниев Б.С. Чистоуст величавый (*Osmunda regalis* L. 1753) // Красная книга Краснодарского края. – Краснодар: ООО «Дизайн-Бюро № 1», 2007. – С. 75.
15. Bharati SK, Dutta Choudhury M, Mazumder BP *In vitro* propagation of *Dipteris wallichii* (R. Br.) T. Moore: a hope for conservation of an endangered *Pteridophyte* // Int Res J Pharm, 2013. – № 4(3). – P. 21-219. – doi:10.7897/2230-8407.04346.
16. Bonomo M.C., Marti'nez O.G., Tanco M.E., Cardozo R., Avile's Z. Spores germination and gametophytes of *Alsophila odonelliana* (*Cyatheaceae*) in different sterile media // UYTON, 2013. – № 8 – P. 119-126.
17. Das S., Dutta Choudhury M., Mazumder B.P. *In vitro* propagation of *Cyathea gigantea* (Wall ex. Hook) a tree fern // Int J. Rec Sci Res. – 2013. – № 4(3). – P. 211-224. – doi. org/10.1093/jxb/erg101.
18. Fernandez H., Bertrand A.M., Sa'nchez-Tame's R. Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis* // Plant Cell Rep 1997. – № 16. – P. 358-362. – doi. org/10.1007/BF01088297.
19. Goller K., Rybczyn'ski J.J. Gametophyte and sporophyte of treeferns *in vitro* culture // Acta Soc Bot Pol. – 2007. – № 76. – P. 193-199.
20. Mi'kula A., Makowski D., Walters C., Rybczyn'ski J.J. Exploration of cryo-methods to preserve tree and herbaceous fern gametophytes. In: Ferna'ndez H, Kumar A, Revilla MA (eds) Working with ferns: issues and applications // Springer Science Business Media. – New York, 2011. – P. 173–192. – doi: 10.1007/978-1-4419-7162-3_13.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. – 1962. – № 15. – P. 473-497.
22. Parajuli J., Joshi S.D. *In vitro* study of effects of growth hormones on sporophyte development of *Cyathea spinulosa* // Int J Biodivers Conserv. – 2014. – № 6. – P. 247–255. – doi: 10.5897/IJBC2014.0684.
23. Ravi B.X., Jeyachandran R., Melghias G. *In vitro* spore germination and gametophytic growth development of a critically endangered fern *Pteris tripartita* Sw. // Afr J. Biotech. – 2014. – № 13(23). – P. 2350–2358. – doi: 10.5897/AJB2013.13419.
24. Rybczyn'ski J., Mi'kula A. Tree ferns biotechnology: from spores to sporophytes. In: Ferna'ndez H, Kumar A, Revilla MA (eds) Working with ferns: issues and applications // Springer Science Business Media. – New York, 2011. – P. 135–147. – doi: 10.1007/978-1-4419-7162-3_10.

INTRODUCTION OF *OSMUNDA REGALIS* L. TO *IN VITRO*

Malyarovskaya V. I., Rakhmangulov R S., Koninskaya N. G.

Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,
Sochi, Russia, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

The paper studied the introduction of an endangered, rare fern *Osmunda regalis* L. into sterile culture. It was found that within the introduction of *O. regalis* sporangia to tissue culture the most optimal sterilizing agents were 2% hydrogen

peroxide in the 20-minute exposure (54.1 % of viable spores) and 5 % sodium hypochlorite in the 20-minute exposure (48.4 % of viable spores). It was revealed that the best nutrient medium for micro-propagation of fern gametophytes contains ½ of the micro and macrosols composition according to Murashige-Skoog (MS) without ammonium nitrate and vitamins.

Key words: *Osmunda regalis*, fern, *in vitro* culture, gametophyte, sterilization, nutrient media.