optimal conditions for the mass clonal reproduction for each specific genotype at all technology stages while maintaining its genetic uniformity and resistance. The culture medium is one of the main factors influencing the morphogenesis of plants in the *in vitro* system. The purpose of this work was to investigate the possibility of using the WPM medium as a base when further modification is carried out to optimize the cultivation medium for effective clonal micropropagation of grape rootstocks. The rootstock grape cultivars 'Fercal' clone 242, 'Ruggeri 140', and 'Gravesak' (clones No. 11 and 12) were used as research material. The control was the rootstock 'Kober 5 BB'. The study was carried out on a WPM medium with the addition of NAA (α-naphthylacetic acid) 0.05 mg/l. The results have shown that in this medium, harmonious growth is observed in all the studied rootstocks, higher biometric indicators have been recorded compared to the control cultivar, and the formation of more powerful morphological structures has also been recorded. Thus, the WPM medium can be used as a base for the development of an effective technology for clonal micro-propagation of the rootstocks 'Fercal' clone 242, 'Ruggeri 140', 'Gravesak' 11 and 'Gravesak' 12 in the *in vitro* system. Taking into account the morphogenesis features of these rootstocks, it is necessary to optimize the cultivation environment for each cultivar.

***Key words:*** microcutting, morphogenesis, shoot formation, rooting, *in vitro*, rootstock 'Kober 5 BB', rootstock 'Ruggeri 140', rootstock 'Fercal' clone 242, rootstock 'Gravesack' (11 and 12).

УДК 631.523:634.1:635.9 doi: 10.31360/2225-3068-2022-82-103-114

# ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *OSMUNDA REGALIS* L. МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

**Шхалахова Р.М., Маляровская В.И., Конинская Н.Г., Киселёва Н.С.**

*Федеральный исследовательский центр*
*«Субтропический научный центр Российской академии наук»,*
*г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru*

В настоящее время во всем мире остро стоит вопрос сохранения биологического разнообразия, связанного с увеличением антропогенной нагрузки на окружающую среду. Одним из эффективных способов решения данной проблемы является привлечение методов биотехнологии, которые имеют ряд преимуществ перед традиционно используемыми подходами. Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме сохранения исчезающих видов растений природной флоры Западного Кавказа. Особое внимание уделено редкому исчезающему виду папоротника *Osmunda regalis* L., который внесён в Красную книгу РФ. Одна из проблем исчезновения осмунды королевской в том, что в естественных местах обитания споры этого вида папоротника быстро теряют жизнеспособность. Данное исследование посвящено изучению особенностей размножения *Osmunda regalis* в условиях *in vitro.* Объектом исследований служили гаметофиты папоротника, полученные из спор собранных растений,

произрастающих *in situ*, в период с середины мая по первую декаду июня, на территории отдела ботанического сада «Дерево Дружбы». Изучено влияние экзогенных регуляторов роста (НУК, ИМК, $ГК_3$) на коэффициент размножения гаметофитов и спорофитов осмунды королевской *in vitro*. Установлено, что содержание в питательной среде НУК 0,25 мг/л и $ГК_3$ 0,1 мг/л индуцировало наибольшее количество гаметофитов и спорофитов на протяжении 18 недель культивирования (6,5–16,2 и 5,1–9,7, соответственно). Выявлено, что на морфометрические показатели (длину корней и высоту спорофитов) статистически достоверно влияние длительности культивирования (48,82–51,97 %). В то же время на коэффициент размножения (количество спорофитов) наибольшее влияние оказывал вариант питательной среды 41,75 %, при этом вклад дисперсии фактора «длительность культивирования» был ниже и составил 37,59 %.

***Ключевые слова:*** гаметофиты, исчезающий вид, микроразмножение, осмунда королевская, питательная среда, регуляторы роста, спорофиты, условия *in vitro*.

**Введение.** Папоротники являются ценными декоративными растениями, а в медицинском плане продуцентами биологически активных веществ. Воспроизводство редких и исчезающих видов папоротников важно для сохранения видового разнообразия растений. К настоящему времени накоплен обширный материал по культивированию папоротников в условиях *in vitro* [9]. Важность сохранения различных видов папоротников, считается одной из приоритетных задач, которую решают многие исследователи в мире [11, 22, 24, 26–28]. Среди различных видов папоротников особое место принадлежит *Osmunda regalis* L. относящейся к семейству *Osmundaceae*. Общий ареал вида включает Атлантическую, Центральную и Юго-Восточную Европу, Средиземноморье, Юго-Западную (Турция) и Южную Азию, Южную Африку, Америку [5]. Вид был описан в Европе и штате Виргиния на Атлантическом побережье США. Необходимо отметить, что вид сокращается во многих частях Европы и стал редким или находится под угрозой исчезновения. *O. regalis* включён в национальные Красные списки некоторых стран [21]. Этот вид отнесён к категории «Находящийся под угрозой исчезновения» и внесён в Красную книгу РФ [5]. Известно, что Адлерский район г. Сочи, расположенный в Имеретинской низменности с болотистыми ольховыми лесами, являлся единственным в России местом произрастания осмунды королевской. По данным Тимухина (1999) в 1987 г. на территорию Сочинского национального парка (СНП) из Республики Абхазия пересажено 267 экземпляров чистоуста величавого [8]. Однако, в последние годы катастрофическое падение численности данного вида в местах произрастания, поставило его под угрозу полного исчезновения. Проблема усугубляется и тем, что споры длительное время не прорастают в почве во влажных условиях [17]. Также одной из причин является то, что споры этих папоротников хлорофилловые

(зелёные, фотосинтетические) [20]. Такие споры не только прорастают быстрее, чем их не хлорофилловые (не зелёные) аналоги, но в естественных местах обитания также быстро теряют жизнеспособность. Вместе с тем, в условиях *in vitro* время прорастания спор папоротников варьирует от нескольких дней до нескольких месяцев [6, 18]. При этом на этапе культивирования гаметофитов *in vitro* наблюдается большая скорость их роста. В соответствующих условиях гаметофиты активно растут, образуя скопления кластеров [7]. Особенно важно влияние физических и химических факторов, в том числе и фитогормонов на все процессы, участвующие в их росте и развитии [7, 12, 15, 24]. Необходимо отметить, что требования к питанию могут отличаться в зависимости от вида папоротников [13, 14]. Есть мнение, что гаметофиты *Osmunda regalis* (протолепный папоротник спорангиат) лучшего развития достигают на среде Кнопа, тогда как их рост ингибируется на питательной среде МС и 1/2 МС из-за высокого уровня осмотического давления [13, 15]. Однако, по данным других авторов гаметофиты *Osmunda regalis* активно развивались на питательной среде с 1/2 и 1/8 МС [6, 21].

Известно, что индукция ризогенеза у спорофитов папоротников может происходить спонтанно в отсутствии регуляторов роста [10, 16]. В то же время имеются данные об эффективности применения ауксинов (НУК 0,01 мг/л, ИМК 2 мг/л) для стимуляции корнеобразования у папоротников [10, 18]. Таким образом, данные по наличию или отсутствию регуляторов роста на этапе регенерации и размножения спорофитов видоспецифичны. ***Целью данного исследования*** явилось изучение влияния фитогормонов роста на коэффициент размножения спорофитов и гаметофитов *Osmunda regalis*.

**Объект и методы исследований.** Работа была выполнена в отделе биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН (2020–2021 гг.). Объектом исследований служили гаметофиты *Osmunda regalis*, полученные из спор, собранных с растений *in situ*, в период с середины мая по первую декаду июня, на территории отдела ботанического сада «Дерево Дружбы». В исследованиях использованы классические приёмы культуры клеток и тканей [2].

Стерилизация спорангиев, введение их в стерильную культуру, а также влияние компонентов питательной среды на индукцию гаметофитов приведены в наших предыдущих работах [6, 7]. Шестинедельные гаметофиты спорового происхождения использовали в качестве исходного материала для изучения влияния различных регуляторов роста на индукцию ризогенеза и коэффициент размножения спорофитов (рис. 1).

Эксперимент заложен на среде 1/2 МС (Мурасига-Скуга) [25] в отсутствии нитрата аммония ($NH_4NO_3$) и витаминов (контроль), вариант 1 – 1/2 MS (без $NH_4NO_3$ и витаминов), с нафтилуксусной кислотой (НУК)

0,25 мг/л и гиббереллиновой кислотой ($ГК_3$) 0,1 мг/л; вариант 2 – 1/2 MS (без $NH_4NO_3$ и витаминов), индолилмасляной кислотой (ИМК) 0,1 мг/л, в присутствии 30 % сахарозы. Оценена эффективность сочетаний 1/2 MS с различными регуляторами роста на рост и развитие гаметофитов и спорофитов папоротника. Процент пролиферирующих эксплантатов, количество новообразованных корней гаметофитов и коэффициент размножения спорофитов на группу гаметофитов оценивали через 7, 10, 18 недель культивирования (без субкультуры). Регуляторы роста вводили в среду в стерильных условиях ламинарного бокса после автоклавирования. Гаметофиты папоротника культивировали в условиях культурального помещения при температуре 24 ±1 °С, 16-часовом фотопериоде, освещённости 3 000 лк. Опыты проводили в трёхкратной повторности. Статистическую обработку результатов исследований проводили в пакете STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., США) и пакете анализа данных программы MS Excel (2007). Значения приводили как среднее при уровне значимости $\alpha = 0,05$. Для оценки степени влияния факторов культивирования на развитие растений *in vitro* использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

**Результаты и их обсуждение.** Изучение типов и концентраций регуляторов роста на коэффициент размножения гаметофитов и спорофитов *O. regalis* выявило, что соотношение в питательной среде регуляторов роста (НУК 0,25 мг/л и $ГК_3$ 0,1 мг/л) индуцировало наибольшее их количество на протяжении 18 недель культивирования (6,5–16,2 и 5,1–9,7, соответственно) (табл. 1). При этом рост и развитие спорофитов, исходя из морфометрических показателей (высоты побегов и длины корней), активнее проходил также на этом варианте питательной среды. Различия между вариантами и контролем достоверно существенны.

На рисунке 2 показана индукция спорофитов *O. regalis* на модифицированных средах, с содержанием различных регуляторов роста (рис. 2).

Влияние регуляторов роста и периода культивирования на индукцию спорофитов *O. regalis* было оценено с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (табл. 2.). Установлено (исходя из данных таблицы 2), статистически достоверное влияние длительности культивирования на морфометрические показатели: длину корней и высоту спорофитов (48,82–51,97 %). В то же время на коэффициент размножения (количество спорофитов) наибольшее влияние оказывал вариант питательной среды 41,75 %, при этом вклад дисперсии фактора «длительность культивирования» был ниже и составил 37,59 %. Вклад дисперсии взаимодействия факторов «вариант среды × длительность культивирования» показал низкие результаты и варьировал от 2,64 % (высота спорофита) до 9,05 % (количество спорофитов).

**Рис. 1.** Кластеры гаметофитов
*Osmunda regalis* L.

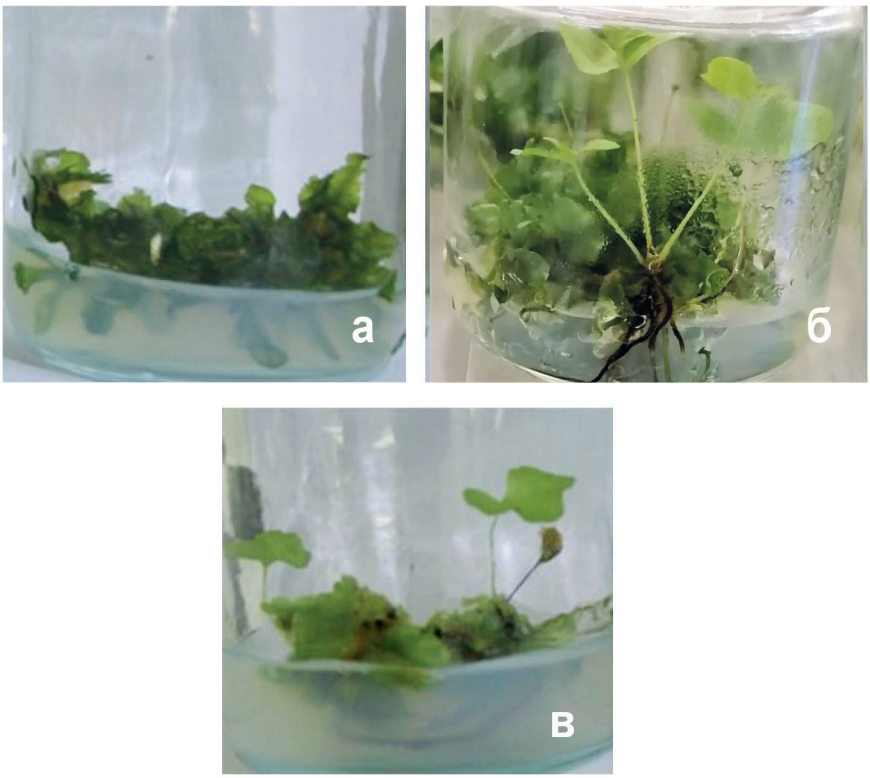


**Рис. 2.** Размножение спорофитов *Osmunda regalis* L.
на питательной среде:
**а** – контроль 1/2 МС; **б** – 1/2 МС НУК 0,25 мг/г, ГК3 0,1 мг/л;
**в** – 1/2 МС ИМК 0,1 мг/л

*Таблица 1*

**Морфометрические показатели и коэффициент размножения гаметофитов и спорофитов растений *O. regalis* L.**

| Вариант, *мг/л* | Коэффициент размножения гаметофитов, *шт.* | | | Коэффициент размножения спорофитов, *шт.* | | | Высота побегов спорофитов, *см* | | | Длина корней спорофитов, *см* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7 | 10 | 18 | 7 | 10 | 18 | 7 | 10 | 18 | 7 | 10 | 18 |
| 1/2 МС НУК 0,25 $ГК_3$ 0,1 | 6,5 | 11,1 | 16,2 | 5,1 | 9,1 | 9,7 | 1,0 | 2,4 | 2,8 | 0,8 | 1,8 | 2,6 |
| 1/2 МС ИМК 0,1 | 5,1 | 7,4 | 12,6 | 3,9 | 6,8 | 7,3 | 0,7 | 1,9 | 2,2 | 0,5 | 1,5 | 2,2 |
| Контроль 1/2 МС | 3,2 | 4,4 | 5,5 | 1,5 | 2,9 | 4,1 | 0,6 | 1,4 | 1,7 | 0,4 | 1,2 | 1,4 |
| $НСР_{05}$ | 0,10 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,08 | 0,10 | 0,08 | 0,03 | 0,12 | 0,01 | 0,01 | 0,03 |

*Таблица 2*

**Результаты дисперсионного анализа**

| Изменчивость | df | mS | F | Дисперсия | Доля от общей дисперсии, *%* |
|---|---|---|---|---|---|
| Высота спорофита, *см* | | | | | |
| Вариант среды | 2 | 6,3720 | 24,818** | 12,7440 | 13,51 |
| Длительность культивирования | 2 | 24,4967 | 95,410** | 48,9935 | 51,97 |
| Вариант среды × Длительность культивирования | 4 | 0,6222 | 2,423 | 2,1889 | 2,64 |
| Остаточная | 117 | 0,2568 | – | 30,0400 | 31,88 |
| Длина корней, *см* | | | | | |
| Вариант среды | 2 | 4,7874 | 15,1578** | 9,5748 | 9,8 |
| Длительность культивирования | 2 | 23,8457 | 75,5032** | 47,6933 | 48,82 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Вариант среды × Длительность культивирования | 4 | 0,8648 | 2,7380* | 3,4590 | 3,54 |
| Остаточная | 117 | 0,3158 | – | 36,9529 | 37,84 |
| Количество спорофитов, *шт.* | | | | | |
| Вариант среды | 2 | 501,167 | 214,440** | 1002,333 | 41,75 |
| Длительность культивирования | 2 | 451,452 | 193,171** | 902,905 | 37,59 |
| Вариант среды × Длительность культивирования | 4 | 54,333 | 23,249** | 217,333 | 9,05 |
| Остаточная | 117 | 2,337 | - | 279,429 | 11,61 |

*Примечание:* df – число степеней свободы; mS – средний квадрат;
F – значение критерия Фишера.
* – отмечены значения F для 5%-ного уровня значимости;
** – для 1%-ного уровня значимости ($F_{05}$ = 2.46, $F_{01}$ = 3.51, $F_ф > F_{05}$)

Во многих работах приведены данные о важном значении регуляторов роста, таких как ауксины и гиббереллины, которые влияют на процессы, связанные с регенерацией культивируемых изолированных тканей. Известно, что гиббереллины не только стимулируют рост клеток за счёт растяжения, но и активизируют деятельность других фитогормонов в растениях [4]. Вместе с тем, ауксины (НУК, ИУК, ИМК и др.) участвуют в синтезе молекул РНК и ДНК, различных белков, а также микротрубочек и митотического веретена. Они транспортируют питательные вещества и воду, под их влиянием активируются кальциевые каналы, находящиеся на плазмалемме. Эти процессы усиливают морфогенный потенциал различных органов растений [1]. Известно, также что регулирующее действие гиббереллинов на рост растений осуществляется в тесной взаимосвязи с ауксинами [3]. В нашем эксперименте наилучшие результаты получены также при введении в питательную среду комбинации регуляторов роста гиббереллина и ауксина НУК (в концентрации 0,1 мг/л и 0,25 мг/л, соответственно), которое эффективно влияло на развитие спорофитов папоротника, по сравнению с контролем, и вариантами, содержащими ИМК и НУК [6].

**Выводы.** Таким образом, нами исследовано влияние различных концентраций экзогенных фитогормонов ауксиновой природы – нафтилуксусной кислоты, индолилмасляной кислоты и гибберреллина на рост и развитие гаметофитов и спорофитов папоротника *O. regalis.* Установлено, что экзогенные регуляторы роста активируют развитие

и рост гаметофитов и спорофитов осмунды королевской, причём степень стимулирования увеличивается в зависимости от комбинации гормонов в питательной среде. Среди использованных экзогенных регуляторов интенсивнее всего влияла на морфогенез гаметофитов и активировала рост и развитие спорофитов папоротника комбинация НУК и гиббереллина в концентрации 0,25 мг/л и 0,1 мг/л, соответственно. Изучение факторов, влияющих на процессы развития гаметофитов в условиях *in vitro*, имеют как теоретическое, так и практическое значение, потому что позволяют пополнить знания о морфогенезе в целом и разработать биотехнологическую методологию сохранения и размножения исчезающего вида растений природной флоры *O. regalis.*

*Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СНЦ РАН № FGWR-2022-0008*

**Список литературы**

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений. М.: Издательский центр «Академия», 2005, 640 с. ISBN: 5-7695-1669-0.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 158 с. ISBN: 5-89240-059-х.
3. Гамбург К.З., Кулаева О.Н., Муромцев Г.С. и др. Регуляторы роста растений. М.: Колос, 1979, 246 с.
4. Захарычев В.В. Гербициды и регуляторы роста растений. Основы биохимии и применения. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007, 204 с. ISBN: 978-5-7237-0564-7.
5. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы. отв. ред. С.А. Литвинская. Краснодар: Дизайн Бюро, 2007, 639 с. ISBN: 978-5-91111-006-2.
6. Маляровская В.И., Рахмангулов Р.С., Конинская Н.Г. Введение в культуру *in vitro Osmunda regalis* L. Субтропическое и декоративное садоводство. 2020 а; 72 : 86-93. DOI: 10. 31360/2225-3068-2020-72-89-93.
7. Маляровская В.И., Рахмангулов Р.С., Конинская Н.Г. Влияние состава питательной среды на развитие спорофитов *Osmunda regalis* L. *in vitro.* Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2020 б; 135 : 104-111. DOI: 10.36305/0513-1634-2020-135-104-111.
8. Тимухин И.Н. Результаты реинтродукции папоротника чистоуста величавого (*Osmunda regalis*) в России: Горные растительные ресурсы: теория и прогноз освоения и воспроизводства – 1999: сб. трудов межд. симпозиума 20-23 сентября Махачкала-Гулиб, 1999; 44-46.
9. Шелихан Л.А., Некрасов Э.В. Размножение папоротников посредством спор в культуре *in vitro* (обзор литературы). Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2018; 20 : 23-42. DOI: 10.1758l/bbgi2003.
10. Avila-Perez M.C.R., White-Olascoaga L., Arzate-Fernandez AM. *In vitro* regeneration of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching). Amer. Fern J. 2011; 101 : 25-35. DOI: 10.1640/0002-8444-101.l.2513.
11. Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A, Kosakivska I.V. Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte *in vitro* culture. Cyt. Gen. 2018; 52(2) : 117-126. DOI: 10.3103/ s0095452718020032.

12. Camloh M., Ravnikar M., Zel J. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation rhizoids and early development of gametophytes. Physiol. Plant. 1996; 97 : 659-664. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996. tb00529.x.
13. Fernandez H., Bertrand A.M., Feito I. et al. Gametophyte culture *in vitro* and antheridiogen activity in Blechnum spicant. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1997; 50 : 71-74.
14. Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. Plant Cell Tis. Organ Cult. 1999; 56(3) : 211-214. DOI: 10.1023/A:1006277229136.
15. Fernandez H., Revilla M.A. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tis. Organ Cult. 2003; 73(1) : 1-13. DOI: 10.1023/A:1022650701341.
16. Haddad S., Bayerly R. *In vitro* propagation of ferns (*Asplenium nidus*) via spores culture. lord. J. Agricult. Sci. 2014; 10(1) : 144-153. DOI: 10.12816/0029880.
17. Ibars A.M., Gomez-serrano M.A., Mayoral O., Estrelles E. Prioridades para la conservación en el ámbito de los helechos en Castilla-La Manch. In Hernandez J.E., Herranz J.M. (Eds), Protección de la diversidad vegetal y de los recursos fitogenéticos de Castilla-La Mancha. 2011; 189-213.
18. Khan S., Raziq M., Kayani H. A. *In vitro* propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. Pak. J. Bot. 2008; 40(1) : 91-97.
19. Kodym A., Lang M., Delpratt J. Propagation by partial tissue culture of austral bracken (*Pteridium esculentum*) for revegetation. Ecol. Manag. Restorat. 2016; 17 : 159-163. DOI: 10.1111/emr.12209.
20. Lloyd R.M., Klekowski E.J. Spore germination and viability in pteridophytes: evolutionary significance of chlorophylous spores. Biotropica. 2000; 2(2) : 129-137.
21. Makowski D., Tomiczak K., Rybczynski J. J., Mikula A. Integration of tissue culture and cryopreserva- tion methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. Acta Physiol. Plant. 2016; 38 : 19. DOI: 10.1007/s11738-015-2037-y.
22. Maridass M., Mahesh R., Raju G., Muthuchelian K. Clonal propagation of *Adiantum capillus-veneris*. Int. J. Biol. Tech. 2010; 1(1) : 33-37.
23. Marimuthu J., Manickam V.S. *Ex situ* conservation of two threatened ferns of the western ghats through in vitro spore culture. J. Threat. Taxa. 2011; 3(7) : 1919-1928. DOI: 10.11609/JoTT.o2687.1919-28.
24. Menendez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernandez H. The effect of exogenous and endogenous phyto hormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L. Acta Physiol. Plant. 2011; 33(6) : 2493-2500. DOI: 10.1007/s11738- 011-0794-9.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962; 5 : 473-497. DOI: 10.llll/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Pence V.C. *In vitro* propagation and cryopreservation of the endangered filmy fern, *Trichomanes punctatum* subsp. floridanum (Hymenophyllaceae). Fern Gaz. 2014; 19(8) : 307-317.
27. Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A. Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro*. In: Current advances in fern research. Cham, Switzerland. 2018; 99-120. DOI: 10.1007/978-3-319-75103-0-5.
28. Simoes-Costa M.C., Moura I.R., Silva M.J., Duarte M.C. *In vitro* culture of spores from *Woodwardia fimbriata* Smith. Acta Hortic. 2015; 1083 : 281-285. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.35.

**References**

1. Alyokhina N.D., Balnokin Y.V., Gavrilenko V.F. et al Physiology of plants. M.: Izdatel'skii tsentr «Akademiya», 2005, 640 p. [In Rus.]
2. Butenko R.G. Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology on their basis. M.: FBK-PRESS, 1999, 158 p. [In Rus.]
3. Hamburg K.Z., Kulaeva O.N., Muromtsev G.S., etc. Plant Growth regulators. M.: Kolos, 1979, 246 p. [In Rus.]
4. Zakharychev V.V. Herbicides and plant growth regulators. Basics of biochemistry and application. M.: RKhTU named after D.I. Mendeleev, 2007, 204 p. [In Rus.]
5. The Red Book of the Krasnodar Territory: Plants and fungi/ed. S.A. Litvinskaya. Krasnodar: Design Bureau, 2007, 639 p. [In Rus.]
6. Malyarovskaya V.I., Rakhmangulov R.S., Koninskaya N.G. Introduction of *Osmunda regalis* L. to *in vitro*. Subtropical and ornamental gardening. 2020 a; 72 : 86-93. [In Rus.]
7. Malyarovskaya V.I., Rakhmangulov R.S., Koninskaya N.G. Nfluence of the composition of the culture media on the development of sporofites *Osmunda regalis* L. *in vitro*. Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden. 2020 b; 135 : 104-111. [In Rus.]
8. Timukhin I.N. Results of reintroduction of the purest majestic fern (*Osmunda regalis*) in Russia: Mountain plant resources: theory and forecast of development and reproduction – 1999: collection of works inter. symposium on September 20-23 Makhachkala-Gulib, 1999; 44-46. [In Rus.]
9. Shelikhan L.A., Nekrasov E.V. Fern propagation via spore culture in vitro (a review). Bulletin of the Botanical Garden-Institute of the DVO Russian Academy of Sciences, 2018; 20 : 23-42. [In Rus.]
10. Avila-Perez M.C.R., White-Olascoaga L., Arzate-Fernandez AM. *In vitro* regeneration of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching). Amer. Fern J. 2011; 101 : 25-35. DOI: 10.1640/0002-8444-101.l.25 13.
11. Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A, Kosakivska I.V. Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte *in vitro* culture. Cyt. Gen. 2018; 52(2) : 117-126. DOI: 10.3103/ s0095452718020032.
12. Camloh M., Ravnikar M., Zel J. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation rhizoids and early development of gametophytes. Physiol. Plant. 1996; 97 : 659-664. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996. tb00529.x.
13. Fernandez H., Bertrand A.M., Feito I. et al. Gametophyte culture in vitro and antheridiogen activity in Blechnum spicant. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1997; 50 : 71-74.
14. Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. Plant Cell Tis. Organ Cult. 1999; 56(3) : 211-214. DOI: 10.1023/A:1006277229136.
15. Fernandez H., Revilla M.A. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tis. Organ Cult. 2003; 73(1) : 1-13. DOI: 10.1023/A:1022650701341.
16. Haddad S., Bayerly R. *In vitro* propagation of ferns (*Asplenium nidus*) via spores culture. lord. J. Agricult. Sci. 2014; 10(1) : 144-153. DOI:10.12816/0029880.
17. Ibars A.M., Gomez-serrano M.A., Mayoral O., Estrelles E. Prioridades para la conservación en el ámbito de los helechos en Castilla-La Manch. In Hernandez J.E., Herranz J.M. (Eds), Protección de la diversidad vegetal y de los recursos fitogenéticos de Castilla-La Mancha. 2011; 189-213.
18. Khan S., Raziq M., Kayani H. A. *In vitro* propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. Pak. J. Bot. 2008; 40(1) : 91-97.
19. Kodym A., Lang M., Delpratt J. Propagation by partial tissue culture of austral bracken (*Pteridium esculentum*) for revegetation. Ecol. Manag. Restorat. 2016; 17 : 159-163. DOI: 10.1111/emr.12209.

20. Lloyd R.M., Klekowski E.J. Spore germination and viability in pteridophytes: evolutionary significance of chlorophylous spores. Biotropica. 2000; 2(2) : 129-137.
21. Makowski D., Tomiczak K., Rybczynski J.J., Mikula A. Integration of tissue culture and cryopreserva- tion methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. Acta Physiol. Plant. 2016; 38 : 19. DOI: 10.1007/s11738-015-2037-y.
22. Maridass M., Mahesh R., Raju G., Muthuchelian K. Clonal propagation of *Adiantum capillus-veneris*. Int. J. Biol. Tech. 2010; 1(1) : 33-37.
23. Marimuthu J., Manickam V.S. Ex situ conservation of two threatened ferns of the western ghats through *in vitro* spore culture. J. Threat. Taxa. 2011; 3(7) : 1919-1928. DOI: 10.11609/JoTT.o2687.1919-28.
24. Menendez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernandez H. The effect of exogenous and endogenous phyto hormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L. Acta Physiol. Plant. 2011; 33(6) : 2493-2500. DOI: 10.1007/s11738- 011-0794-9.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962; 5 : 473-497. DOI: 10.llll/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Pence V.C. *In vitro* propagation and cryopreservation of the endangered filmy fern, *Trichomanes punctatum* subsp. floridanum (Hymenophyllaceae). Fern Gaz. 2014; 19(8) : 307-317.
27. Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A. Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro*. In: Current advances in fern research. – Cham, Switzerland. 2018; 99-120. DOI: 10.1007/978-3-319-75103-0-5.
28. Simoes-Costa M.C., Moura I.R., Silva M.J., Duarte M.C. *In vitro* culture of spores from *Woodwardia fimbriata* Smith. Acta Hortic. 2015; 1083 : 281-285. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.35.

## REPRODUCTION SPECIFICS OF *OSMUNDA REGALIS* L. BY METHODS OF BIOTECHNOLOGY

**Shkhalakhova R.M., Malyarovskaya V.I., Koninskaya N.G., Kiseleva N.S.**

*Federal Research Centre*
*the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,*
*Sochi, Russia, e-mail: malyarovskay@yandex.ru*

Currently, the issue of conserving biological diversity is acute all over the world, associated with an increase in anthropogenic pressure on the environment. One of the effective ways to solve this problem is to use biotechnology methods, which have a number of advantages over traditionally used approaches. The paper is devoted to the current problem of conserving endangered plant species grown in the natural flora of the Western Caucasus. Special attention is paid to the endangered species of royal fern *Osmunda regalis* L., which is listed in the Red Book of the Russian Federation. The reason why *Osmunda regalis* L. disappears is because in natural habitats the spores of this species quickly lose their viability. This study is devoted to the investigation of its reproduction *in vitro*. The object of research was royal fern gametophytes obtained from spores of plants growing *in situ* on the territory of the botanical garden "Friendship Tree", in the period from mid-May to early June. The influence of exogenous growth regulators (NAA,

IBA, $GA_3$) on the reproduction coefficient of gametophytes and sporophytes of *Osmunda regalis* L. *in vitro* has been studied. It has been found that the content of 0.25 mg/l NAA and 0.1 mg/l $GA_3$ in the nutrient medium induced the largest number of gametophytes and sporophytes during 18 weeks of cultivation (6.5–16.2 and 5.1–9.7, respectively). It has been revealed that the morphometric parameters (root length and height of sporophytes) were statistically influenced by the duration of cultivation (48.82–51.97 %). At the same time, the reproduction coefficient (the number of sporophytes) was most influenced by the nutrient medium variant 41.75 %, while the contribution of the dispersion factor "cultivation duration" was lower and amounted to 37.59 %.

***Key words:*** gametophytes, endangered species, micro-reproduction, *Osmunda regalis* L., nutrient medium, growth regulators, sporophytes, *in vitro* conditions.