

УДК 581.1

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПАПОРОТНИКОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПОСРЕДСТВОМ ЗЕЛЕННЫХ ГЛОБУЛЯРНЫХ ТЕЛ¹

© 2023 г. Л. А. Шелихан*

Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического сада-института Дальневосточного отделения Российской академии наук, Благовещенск, Россия

*e-mail: solecito91@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

Зеленые глобулярные тела (от англ. green globular bodies, GGB) представляют собой особые побеги — пропагулы, формирующиеся при культивировании тканей растений *in vitro*. Благодаря высокой скорости размножения, GGB считаются экономически выгодными для регенерации *in vitro* важных пищевых и декоративных папоротников. Кроме того, размножение с использованием этих меристемных структур открывает большие перспективы сохранения редких или находящихся под угрозой исчезновения папоротников. Ткани GGB можно использовать для долгосрочного хранения методом криоконсервации клеточных культур *in vitro*. В обзоре представлено современное состояние исследований по размножению папоротников *in vitro* через регенерацию GGB. Рассмотрены понятие GGB и этапы их развития. Обсуждаются условия для введения в культуру *in vitro* GGB, их инициации, пролиферации, дифференциации, а также укоренения и акклиматизации спорофитов. Особое внимание уделено влиянию на эффективность размножения GGB состава питательных сред.

Ключевые слова: зеленые глобулярные тела, культура *in vitro*, папоротники, спорофит, эксплант

DOI: 10.31857/S0015330322600498, **EDN:** GKSFDY

ВВЕДЕНИЕ

Папоротники (мониллофиты) и ликлофиты составляют около 4% всех растений Земли. Среди папоротников представлены виды, обладающие экономической, лекарственной, пищевой и биотехнологической ценностью [1–5]. Некоторые виды могут быть использованы в качестве биоиндикаторов радиационного загрязнения или для фиторемедиации, поскольку способны извлекать из почвы и накапливать в своих тканях вредные для окружающей среды вещества [6–10]. Большое число видов папоротников находится под угрозой исчезновения из-за разрушения и загрязнения местообитания, бесконтрольного сбора, внедрения инвазивных видов и изменения климатических условий. Многие виды папоротников включены в национальные и региональные Красные

книги [11, 12]. Получение таких меристемных структур как зеленые глобулярные тела (от англ. green globular body, GGB) для дальнейшего массового размножения спорофитов *in vitro* является перспективным и наиболее экономически выгодным для сохранения и воспроизводства хозяйственно-значимых, декоративных, редких или находящихся под угрозой исчезновения видов папоротников, а также для выведения их новых разновидностей [13, 14].

Цель обзора — обобщение информации о GGB как системе размножения папоротников в культуре *in vitro*.

ПОНЯТИЕ GGB И ЭТАПЫ ИХ РАЗВИТИЯ

Меристемные структуры, о которых пойдет речь, впервые были описаны в 1987 г. в публикации по микроразмножению папоротника *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl Higuchi с соавторами [13]. В этой системе размножения впервые применяли термин “green globular body” (GGB). Меристемные многоклеточные тела были использованы в качестве промежуточной стадии для размножения перед получением спорофитов, а органогенез GGB контролировался единственным регулятором роста — 6-бензиламинопурином (БАП). Позднее, в 1989 г.

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600498 для авторизованных пользователей.

Сокращения: МС — полный состав минеральной основы МС-среды, 1/2МС — половинная концентрация минеральной основы МС-среды, 1/4МС — 1/4 концентрация минеральной основы МС-среды, 1/8МС — 1/8 концентрация минеральной основы МС-среды, 3/4МС — 75% концентрация минеральной основы МС-среды, GGB — зеленые глобулярные тела (green globular body).

в статье Higuchi и Amaki был опубликован протокол по размножению *in vitro* папоротника *Asplenium nidus* L., для которого была использована та же система [15]. Учеными было отмечено несколько преимуществ использования GGB для размножения папоротников: возможность легко контролировать ход органогенеза во время этапов культивирования, просто добавляя или удаляя регулятор роста растений, а также высокие коэффициенты и скорость размножения [16–18]. Последнее утверждение обусловлено тем, что материнские и дочерние GGB могли участвовать в одновременном формировании следующего вегетативного поколения [19].

По мнению Amaki и Higuchi, инициированная структура (GGB) функционально подобна протокорму орхидей [16], поскольку у обоих были мощные центры клеточного деления (клетки меристемы), которые регенерировали в придаточные побеги [15]. Однако протокормы представляют собой образующиеся спонтанно, свободно растущие многоклеточные комплексы, тогда как GGB не формируются на частях тканей экспланта до тех пор, пока не происходит инициация в культуре *in vitro*. Согласно другим исследователям, GGB имеют сходные с каллусом морфологические черты, так как функционально являются частью меристемы, в которой агрегированы зачатки побегов [20]. Тем не менее, формирование каллуса и регенерация побега — это две разные стадии в культуре тканей растений, образования одного каллуса недостаточно для регенерации побегов в отличие от GGB. Предполагают, что GGB представляют собой луковички, выводковые почки или меристематические узелки [19, 21–23]. В публикации 2021 г. GGB назвали особым побегом — пропагулой, инициируемой в системах культивирования растений *in vitro* [14]. Интересно, что GGB, происходящие от разных видов папоротников, проявляли отличительные особенности с точки зрения скорости роста, внешнего вида и размера [17, 19, 24]. Тем не менее, эти структуры окрашены в зеленый цвет из-за наличия хлорофилла в клетках и имели округлую форму, напоминающую стеклянные бусинки. При этом оттенки зеленого варьировали от коричнево- и желто-зеленого до ярко- и темно-зеленого [17, 22, 24, 25]. В процессе развития GGB были связаны с материнской меристемной тканью через корнеобразные структуры — бледно-коричневые ризоиды [14, 17, 24]. Иногда на поверхности некоторых культур GGB помимо этих ризоидов, можно было увидеть чешуйчатые или трихомоподобные структуры [14, 17, 21, 24, 25].

Однако исследователи детально не рассматривали цито- и гистологическое происхождение GGB. Наиболее общей чертой GGB является то, что они содержат области множественных клеточных делений во внутренних тканях и/или в

эпидермальном слое самих GGB [13, 16], а также развивающиеся проводящие ткани внутри [14].

Этапы развития GGB можно наблюдать под биноклем. Процесс инициации начинается с формирования твердой массы зеленой меристемной ткани на экспланте. По одним данным она напрямую связана с основной системой сосудистых пучков эксплантов, однако эта связь исчезала после развития GGB [19]. По другим данным, между ними не было обнаружено соединяющей их проводящей ткани. Вместо этого связь между тканью и эксплантом обеспечивали клетки, которые выглядели инвазивными в тканях экспланта [14]. Следующий этап — это непосредственно пролиферация GGB. В это время одиночное тело едва различимо, оно не отделяется от зеленой массы, либо отделяется с трудом. Его верхняя часть имеет плоскую или куполообразную форму [25]. Тем не менее, возникшие множественные меристематические области отчетливо видны на поверхности или во внутренней части GGB. Впоследствии развившиеся GGB легко отделяются от основной массы и способны дифференцироваться в спорофиты [17, 26]. Это проявлялось в виде удлинения тела и появления выступа на поверхности GGB. Чем больше развивалось спорофитов, тем меньше площади поверхности GGB оставалось для мест активного деления и размножения клеток меристем. Как только масса GGB оказывалась полностью покрыта регенерированными спорофитами, одиночный GGB деформировался и прекращал дальнейшее размножение [17]. Процессы пролиферации и дифференциации чаще всего накладывались друг на друга, поскольку шли одновременно [14]. Есть мнение, что способность к самостоятельному формированию начальной многопобеговой меристемы GGB одинакова лишь на начальной стадии побегообразования *in vitro*, а впоследствии качественные и количественные показатели различаются при одинаковых условиях для разных видов [19].

Способ пролиферации GGB у разных видов папоротников может отличаться. Например, меристемы могут быть локализованы во внутренней части GGB, окружая центральную систему сосудистого пучка, при этом каждая меристема связана с сосудистой системой. С развитием меристематических тканей в GGB некоторые меристемы выходят на поверхность, и каждый выступ формирует новый GGB [13]. С другой стороны, клеточные деления могут активизироваться и на периферии GGB [13, 15]. При этом на поверхности GGB зарождаются многочисленные меристемы, некоторые из которых формируют новые GGB [15]. Иногда эти способы пролиферации могут сочетаться [14].

Отдельный GGB обладает двумя важными областями меристемы: апикальной меристемой в

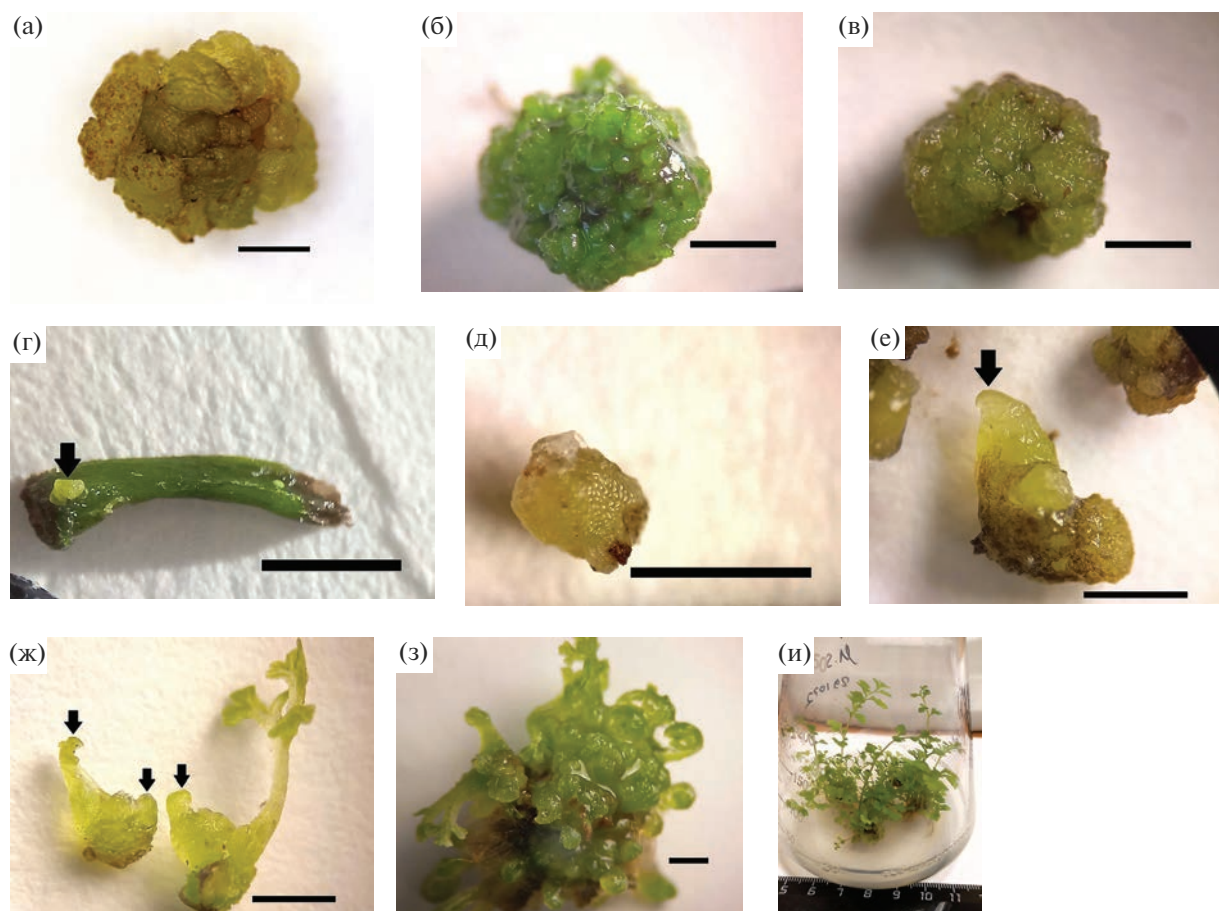


Рис. 1. Размножение папоротников в культуре *in vitro* через регенерацию зеленых глобулярных тел (green globular bodies, GGB): а – GGB *Matteuccia struthiopteris*; б – GGB *Polystichum craspedosorum*; в – GGB *Aleurites kuhnii*; г – начало развития GGB на экспланте *M. struthiopteris*. Стрелка указывает на формирующуюся меристему; д – одиночный GGB *M. struthiopteris*; е, ж, з – дифференциация GGB *M. struthiopteris*. Стрелками отмечены выступы на GGB; и – спорофиты *M. struthiopteris*, развившиеся из GGB. а–и: масштаб 1 мм.

верхней части и корневой меристемой в нижней части. Во время стадии дифференциации апикальная меристема преобразуется в молодой побег, а корневая меристема дает начало корням или нескольким корнеобразным структурам, в результате чего один GGB всегда формирует один спорофит [24, 25]. Следует отметить, что в процессе регенерации спорофитов из GGB исследователями также было отмечено несколько примеров спонтанной апоспии с образованием гаметофитов, соответствующих гаметофитам, продуцируемым из спор [21, 25].

Все растения, полученные с помощью этой системы размножения *in vitro*, были фенотипически однородными и соответствовали фенотипу растений-доноров [15, 16, 21, 46]. Фенотипическую однородность проверяют путем сравнения морфологических признаков папоротников-доноров и папоротников, полученных в результате размножения *in vitro* через регенерацию GGB, акклиматизированных и выращенных в тепличных условиях.

Принято считать, что регенерация через систему GGB в условиях *in vitro* является уникальной системой для размножения папоротников [13, 24]. Однако есть информация, что подобные GGB структуры наблюдали у трех видов цветковых растений [27–29].

В качестве наглядного примера на рисунке 1 показаны группы GGB трех видов папоротников: *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels. и *Aleurites kuhnii* (Milde) Ching, а также отдельные стадии формирования GGB и спорофитов на примере *M. struthiopteris*.

ЭКСПЛАНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ GGB

На данный момент известно о 24 видах папоротников, принадлежащих к 11 семействам, размноженных через регенерацию GGB (табл. 1).

В качестве донора для получения GGB ряд авторов использовали спорофиты из природных популяций, коллекций *ex situ* и коммерческого

Таблица 1. Регенерация различных видов папоротников в культуре *in vitro* посредством GGB

Семейство	Вид	Эксплант	Продуцирование GGB			Ссылка
			%	г	шт	
Aspleniaceae	<i>Asplenium delavayi</i> (Franch.) Copel. (= <i>Sinephropteris delavayi</i> (Franch.) Mickel)	Вайя молодого спорофита	30	—	—	[30]
Aspleniaceae	<i>Asplenium nidus</i> L.	Сегмент корневища	100	—	—	[15, 16]
Aspleniaceae	<i>Asplenium nidus</i> L. (= <i>Neottopteris nidus</i> (L.) J. Sm.)	Молодой спорофит <i>in vitro</i>	100	—	—	[38]
Aspleniaceae	<i>Asplenium scolopendrium</i> var. <i>americanum</i> (Fernald) Kartesz & Gandhi	Молодой спорофит	84	—	—	[39]
Athyriaceae	<i>Athyrium niponicum</i> (Mett.) Hance	Сегмент корневища молодого спорофита <i>in vitro</i>	—	0.171	—	[37]
Athyriaceae	<i>Diplazium nipponicum</i> Tgawa	Сегмент корневища	—	2.27	—	[31]
Blechnaceae	<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth	Сегмент корневища ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	—	—	—	[35]
Dennstaedtiaceae	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	—	—	—	—	[14]
Dryopteridaceae	<i>Polystichum craspedosorum</i> (Maxim.) Diels.	Молодой спорофит <i>in vitro</i>	—	—	20.2	[26]
Dryopteridaceae	<i>Rumohra adiantiformis</i> “Florida”	Сегмент корневища	—	—	—	[16]
Cibotiaceae	<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Sm.	Ювенильный спорофит <i>in vitro</i>	86.67	—	—	[25]
Nephrolepidaceae	<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C. Presl	Сегмент корневища	73.3	—	—	[13, 16]
Nephrolepidaceae	<i>Nephrolepis exaltata</i> (L.) Schott	Сегмент корневища	—	—	8	[42]
Nephrolepidaceae	<i>Nephrolepis exaltata</i> (L.) Schott	Сегмент корневища	100	—	—	[32]
Nephrolepidaceae	<i>Nephrolepis exaltata</i> Schott cv. <i>bostoniensis</i>	Сегмент корневища	—	—	—	[23]
Nephrolepidaceae	<i>Nephrolepis exaltata</i> “Bostoniensis Murano”	—	—	—	—	[49]
Onocleaceae	<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	Боковые побеги на корневище	78.8	—	—	[22]
Onocleaceae	<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	Молодой спорофит	—	—	—	[46]
Onocleaceae	<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	—	98.24	—	—	[47]
Polypodiaceae	<i>Drynaria roosii</i> Nakaike	Сегмент ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	—	—	—	[48]
Polypodiaceae	<i>Platyserium bifurcatum</i> (Cav.) C. Chr.	Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	90	—	—	[21]

Таблица 1. Окончание

Семейство	Вид	Эксплант	Продуцирование GGB			Ссылка
			%	г	шт	
Polypodiaceae	<i>Platyserium bifurcatum</i> (Cav.) C. Chr.	Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	95.56	—	—	[17]
Polypodiaceae	<i>Platyserium grande</i> (A. Cunn.) J. Sm.	Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	27.1	—	—	[43]
Polypodiaceae	<i>Platyserium willinckii</i> T. Moore	Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	58.3	—	—	[43]
Polypodiaceae	<i>Polypodium cambricum</i> L.	Ювенильный спорофит <i>in vitro</i>	80	—	—	[41]
Pteridaceae	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Листочек с вайи	—	—	—	[33]
Pteridaceae	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Свернутая вайя “улитка”	—	—	—	[34]
Pteridaceae	<i>Adiantum raddianum</i> “Fritz Luthi”	Сегмент корневища	100	—	—	[16]
Pteridaceae	<i>Pteris aspericaulis</i> var. <i>tricolor</i> Moore in Lowe	Ювенильный спорофит <i>in vitro</i>	90	—	—	[24]
Pteridaceae	<i>Pteris cretica</i> “Wilsonii”	Сегмент корневища	—	0.01	—	[20]
Pteridaceae	<i>Pteris ensiformis</i> Burm.	Сегмент корневища ювенильного спорофита <i>in vitro</i>	—	—	—	[35]
Pteridaceae	<i>Pteris ensiformis</i> “Victoriae”	Сегмент корневища	100	—	—	[16]
Woodsiaceae	<i>Woodsia alpina</i> (Bolton) Gray	Молодой спорофит <i>in vitro</i>	—	—	—	[36]

Примечание: Прочерк “—” означает отсутствие информации.

ассортимента папоротников [15, 22, 30–34]. В этом случае требовалась подготовка растительного материала: обрезка и предварительная его промывка, поскольку сопутствующее загрязнение и/или лишние ткани могли затруднить процесс обработки стерилизующими агентами для последующего введения в культуру *in vitro*. В случае использования спорофитов, полученных в асептических условиях от гаметофитов *in vitro*, этап с поверхностной стерилизацией тканей исключался [14, 15, 17, 19–21, 24–26, 35–38].

Эксплантами для получения GGB могут служить различные части зрелых спорофитов: вайи, листочки с вай или их отдельные сегменты, верхушки и отводки укореняющихся побегов, сегменты черешка, сегменты корневища, придаточных корней и части их боковых побегов [13, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 31–34, 37, 39–42]. Ряд авторов использовали в качестве эксплантов для получения GGB целые ювенильные, молодые спорофиты и их отдельные части [14, 21, 24–26, 30, 35, 39, 41, 43]. Самую низкую способность к образованию GGB имели кончики корней ювенильного споро-

фита *Polypodium cambricum*: в основном на этом типе экспланта развивались гаметофиты [41].

Некоторые исследователи гомогенизировали ткани вайи или корневища для более активного образования GGB [40, 41]. Однако в этом случае имелся ряд недостатков: необходимо было учитывать размер эксплантов и выбирать относительно молодые растения-доноры. Тем не менее, гомогенизация оказалась эффективной в стимулировании размножения посредством GGB *in vitro* [19, 40, 41].

ИНИЦИАЦИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ GGB

Для поверхностной стерилизации эксплантов исследователи применяли различные стерилизующие агенты. Например, использование 70% этилового спирта с различным временем обработки было наиболее популярным [15, 31, 32, 42, 39]. В ряде работ использовали 1% гипохлорит кальция [13], 1% гипохлорит натрия [31, 42], 0.025% [22] и 0.1% HgCl_2 [30], стрептомицин [42]. Иногда использовали растворы коммерческих отбеливателей в различных концентрациях: 15%

(5.25% гипохлорит натрия) [23], 10% [32], 1 : 20 (содержание хлора 0.26%) [39]. В некоторых случаях для лучшего смачивания поверхности эксплантов к стерилизирующему агенту добавляли эмульгатор Твин-20 в концентрации 0.1% [13] или 0.05% [39].

Согласно имеющимся публикациям, во всех исследованиях для инициации и пролиферации GGB были использованы среды на основе МС-среды [44] (табл. S1, Дополнительные материалы). Полутвердые среды с агаром поддерживали рост тканей лучше, чем жидкие среды при постоянном перемешивании, поэтому GGB на агаризованных средах росли быстрее и были более компактными, по сравнению с рыхлыми, отслоившимися GGB на жидких средах. Причиной снижения роста GGB при выращивании на чашках было механическое повреждение меристемы, инициированное на поверхности GGB, от прикосновения к культуральному сосуду [15, 22]. Наиболее используемые концентрации агара находились в пределах 0.65–0.80%. Было установлено, что отсутствие сахарозы или ее избыточная концентрация снижали количественные показатели размножения GGB [15, 26, 37]. Стандартная концентрация сахарозы для инициации и пролиферации GGB составляла 1–3%. Согласно большинству доступных исследований, максимальная продуктивность в регенерации GGB у разных видов была достигнута на МС-среде полного состава или ее половинной концентрации (1/2МС), а менее всего – на более разбавленных МС-средах (1/4МС и 1/8МС). Таким образом, уменьшение концентрации солей приводило к снижению способности к регенерации и роста GGB [14, 15].

Продукция GGB было одинаковым при освещении белым, синим или красным светом культуры папоротника *Pteris aspericaulis* var. *tricolor* [24].

Учитывая, что ткани GGB папоротника *Platyserium bifurcatum* и *Athyrium niponicum* при культивировании на среде с активированным углем начинали чернеть, использование такой добавки не рекомендовано [17, 37].

GGB способны формироваться и размножаться на средах с различными регуляторами роста. Так, упомянутыми регуляторами роста из группы цитокининов были БАП, кинетин (Кин), 2-изопентиладенин (2iP), тидиазурон (ТДЗ). Некоторые исследователи включали в состав культуральной среды сульфат аденина (Ас), который считается предшественником цитокининов и оказывает сходное с ними действие [42]. В качестве ауксинов в питательных средах использовали ИУК, НУК и индолмасляную кислоту (ИМК). В одном из исследований в среду добавляли АБК, поскольку она тормозила ростовые реакции, которые вызывали

регуляторы роста, что было полезным при криоконсервации [39].

Большинство исследователей использовали БАП (1–2 мг/л) на стадиях инициации и пролиферации [14, 23, 31]. В отдельных случаях, добавление в среду БАП (0.5 мг/л) для культивирования сегментов GGB *Pteris ensiformis* “*Victoriae*” и БАП (1 мг/л) в сочетании с НУК (1 мг/л) для *Adiantum raddianum* “*Fritz Luthi*” также способствовало пролиферации GGB [16]. В исследованиях Li с соавт. [33, 38] среда для культивирования *A. nidus* была дополнена БАП (2 мг/л) и НУК (0.1 мг/л), а для *Adiantum capillus-veneris* – только БАП (2 мг/л), что оказывало положительный эффект на формирование GGB указанных видов. Любопытно, что при включении в среды БАП (1.2 мг/л или 2.3 мг/л) GGB *P. bifurcatum* имели небольшие различия в размерах: в последнем варианте GGB были более мелкими. Однако при использовании обеих концентраций размеры GGB были меньше, чем на среде без цитокинина. Несмотря на это, наличие БАП способствовало формированию большого количества GGB, но их дальнейшая дифференциация была медленнее по сравнению с GGB на среде без цитокининов, из-за чего разделение GGB было затруднительно. Есть мнение, что различия в реакции на добавление БАП зависят от возраста и исходного размера экспланта [21]. В исследовании Liao и Wu увеличение концентрации цитокинина (БАП или 2iP) для *P. bifurcatum* показало постепенное снижение продуцирования GGB [17]. Однако добавление БАП на стадии инициации оказывало более сильный ингибирующий эффект на формирование GGB, чем применение 2iP. Это связано с тем, что 2iP – естественно продуцируемый регулятор роста в папоротниках [17]. В другом исследовании [24], с увеличением концентрации БАП или ТДЗ частота индукции GGB *P. aspericaulis* var. *tricolor* возрастала, а регенерация спорофитов ингибировалась. Добавление в питательные среды ТДЗ (1 мг/л) и ТДЗ (0.6 мг/л) было оптимальным для продуцирования GGB у *Cibotium barometz* [25] и у *P. aspericaulis* var. *tricolor* [24], соответственно. Интересно, что использование НУК (1.2 мг/л) без цитокининов, напротив, показало наилучший результат у *P. bifurcatum*. При этом одиночные GGB хорошо пролиферировали на среде с добавлением НУК (1.2 мг/л) и 2iP (0.5 мг/л). Они показали меньшее образование спорофитов, но более быстрое увеличение массы GGB в диаметре [17].

Индукция GGB также была отмечена на питательных средах без регуляторов роста [13, 15, 17, 20, 26, 32, 37, 41]. Считается, что потребность в экзогенных регуляторах роста зависит от уровня эндогенных гормонов в организме растений. Таким образом, образование GGB на эксплантах из ювенильных спорофитов при культивировании на питательной среде без регуляторов роста мо-

жет быть результатом более высоких уровней эндогенных гормонов [21]. Ряд исследователей считают, что чередование сред положительно влияет на процессы культивирования [15, 16].

Такие показатели как температура, pH питательной среды и суточный ритм освещения в большинстве случаев были общими для всех стадий культивирования. Так, температурный режим варьировал в пределах от 21 до 25°C, а фото-период составлял 16/8 ч. Питательные среды имели pH 5.0–5.8. Время до начала регенерации тканей в GGB по совокупной информации занимало от нескольких недель до нескольких месяцев.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ GGB

Долгосрочное сохранение генофонда папоротников методом криоконсервации клеточных культур *in vitro* рекомендовано для тех видов, споры которых трудно собрать или получить даже в небольших количествах [45]. Однако технология криоконсервации тканей спорофитов и гаметофитов изучена гораздо меньше, чем криоконсервации спор [2]. Опубликовано лишь несколько сообщений о криоконсервированных тканях спорофитов редких таксонов папоротников, поэтому это направление является перспективным и нуждается в дальнейших исследованиях. Известно, что длительное сохранение папоротников *in vitro* путем криоконсервации возможно с использованием GGB [2, 38, 39]. Например, GGB *Asplenium scolopendrium* var. *americanum* были успешно заморожены с применением метода инкапсуляции-дегидратации. Для этого использовали группы GGB размером 2–3 мм. В результате исследователи выяснили, что ткани GGB сохранили жизнеспособность после криоконсервации. Важно отметить, что предварительное культивирование на среде, содержащей АБК, увеличивало выживаемость GGB [39]. В другом исследовании для заморозки GGB папоротника *A. nidus* исследователи использовали метод витрификации в каплях [38]. Для этого на этапе подготовки были отобраны GGB (длина 0.5–1 мм), а также использованы суспензионные культуры клеток GGB. В течение 30–90 дней после оттаивания культуры GGB *A. nidus* эти структуры прошли различные стадии развития. Сначала они чернели из-за процессов окисления, а потом регенерировали новую каллусную ткань и формировали новые меристемы, из которых сформировались GGB, что в конечном итоге привело к дифференциации спорофитов. При этом продление периода культивирования привело к дальнейшему увеличению количества спорофитов. Суспензионные культуры клеток GGB также показали аналогичную способность к вторичному росту.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ GGB

Практически во всех исследованиях указано, что GGB наилучшим образом развиваются в спорофиты при культивировании на среде, не содержащей регуляторов роста [13–17, 19–21, 24, 30, 34, 35, 37, 40–42, 46, 47]. При этом дифференциация GGB могла быть неодновременной, как в случае с *P. bifurcatum* [21]. Известно, что группы GGB *A. nidus* регенерировали в проростки спорофитов на среде без регуляторов роста уже через 2 недели. А через 8 недель после субкультивирования, каждый проросток развивался в спорофит, потенциально готовый к акклиматизации [15]. Похожие результаты описаны для *Pteris cretica* “Wilsonii”, *P. ensiformis* “Victoriae”, *N. cordifolia* и *A. niponicum*. При использовании сред без добавления регуляторов роста все GGB были дифференцированы в спорофиты, тогда как при применении регуляторов роста формирование вай ингибировалось, а сегменты GGB продуцировали только новые меристемы и GGB [16, 20, 37].

Чаще всего исследователи использовали следующие концентрации солей: полный набор МС, 1/2МС и 1/4МС. Высокие концентрации минеральных солей и витаминов в питательной среде подавляли рост побегов [20]. Например, GGB *Nephrolepis exaltata* лучше формировали спорофиты на 3/4МС, чем на полной среде МС [32]. У *P. aspericaulis* var. *tricolor* частота дифференциации GGB на средах 1/4МС и 1/2МС была выше, чем на полной МС. Низкая концентрация минеральных солей способствовала лучшей дифференциации GGB в проростки спорофитов [24]. Основные рекомендуемые концентрации сахарозы для развития спорофитов находились в пределах 1–3%. Концентрация агара для получения спорофитов по результатам большинства исследований варьировала от 0.65 до 0.80%.

Добавление активированного угля в питательную среду значительно ингибировало развитие спорофитов [17]. Однако, для *P. aspericaulis* var. *tricolor* добавление активированного угля было полезно на этапе формирования спорофитов, но затем его исключали [24].

При регенерации спорофитов *P. aspericaulis* var. *tricolor* из GGB спектры света (белый, синий, красный) не влияли на частоту дифференциации GGB, но заметно воздействовали на дальнейший рост спорофитов в высоту. Красный свет способствовал удлинению черешка и получению максимальной высоты ювенильного спорофита (5.70 см). Синий свет, напротив, тормозил удлинение черешка, спорофиты достигали минимальной высоты (3.38 см). Кроме того, различное качество света светодиодов также влияло на морфологию и цвет вай. В отличие от спорофитов под белыми светодиодами, имеющими нормальную морфологию вай, цвет вай был более насыщенным под

синими светодиодами и светлее под красными светодиодами. Спорофиты под белыми или красными светодиодами показали нормальный размер вай, тогда как под синим светом они были меньше [24].

ТЕМПЫ РАЗМНОЖЕНИЯ

Практически во всех работах качественные и количественные показатели размножения папоротников посредством продуцирования GGB варьировали в зависимости от вида, но были достаточно высокими. Например, для *N. cordifolia* можно было получить 160 000 проростков от одного экспланта за 6 месяцев [13]. У большинства эксплантов *P. bifurcatum*, культивируемых в течение 40 дней на среде без БАП, было сформировано 10–35 GGB, а после 3 месяцев культивирования с одного листового экспланта было получено до 150 спорофитов. Кроме того, эффективность регенерации GGB в определенной степени варьировала как в группе GGB на экспланте, так и между эксплантами на одной и той же среде [21]. В исследовании Liao и Wu [17] было получено около 170 спорофитов на один исходный листовой эксплант *P. bifurcatum* в течение 32-недельного периода культивирования. По мнению авторов, количество продуцированных спорофитов могло быть дополнительно увеличено путем перевода культур GGB в условия циклического размножения. В публикации 1999 г. сообщалось, что количество клонированных с помощью GGB спорофитов *M. struthiopteris* превышало 5000 [46]. В статье Bertrand с соавт. [41] с помощью гомогенизации 1 г вайи *P. cambricum* и последующем формировании GGB получали 980 спорофитов за 10 месяцев. В эксперименте с *N. exaltata* на одном экспланте сформировалось по 5–8 проростков [42]. Таким образом, по сравнению с обычным размножением спорами, система размножения GGB более эффективна по скорости и количеству получаемых спорофитов и может быть использована для коммерческого микроразмножения папоротников.

УКОРЕНЕНИЕ И АККЛИМАТИЗАЦИЯ СПОРОФИТОВ

Образование корней у спорофитов в условиях *in vitro* может быть спонтанным или направленным (в отсутствии и присутствии регуляторов роста, соответственно), в условиях *in vitro* и при акклиматизации. Спорофиты *Pteridium aquilinum* и *N. exaltata* укореняли на 1/2МС с НУК (0.1 мг/л) [14] и на МС с ИУК (1.9 мг/л) [32] соответственно. Не укоренившиеся спорофиты *P. bifurcatum* с 3–6 вайями изымали из среды и промывали от остатков агара. Затем спорофиты переносили в горшки с субстратом *ex vitro* для акклиматизации, где они показали спонтанное развитие корней в

течение первых 4 недель [17]. Спорофиты папоротника *A. raddianum* “Fritz Luthi” были обработаны НУК с целью инициации ризогенеза, однако корнеобразование у них было слабым. Тем не менее, спорофиты этого же папоротника с развитыми вайями успешно укоренились на стадии акклиматизации [16]. Имеются данные, что рост спорофитов и корней в длину был наиболее интенсивным на средах без регулятора роста, а полученные в результате культивирования спорофиты были пригодны для акклиматизации без дополнительных манипуляций [20, 30]. Например, укореняемость спорофитов *Asplenium delavayi* на среде без регуляторов роста составила 100% [30]. Также регенерированные проростки *P. bifurcatum* с хорошо развитыми корнями изымали из безгормональной среды, переносили в почву и выдерживали при высокой относительной влажности 2 недели, а затем помещали в теплицу [21]. По результатам исследований Higuchi и Amaki [15], акклиматизация побегов *A. nidus* в вермикулите привела к образованию корней у 90% побегов после 4 недель. При этом обработка регуляторами роста не способствовала укоренению или его угнетению.

В качестве почвенного субстрата для акклиматизации спорофитов исследователи использовали сфагнум, вермикулит, перлит, речной песок, почвенный грунт, торф и их смеси. Состав и соотношения субстратных компонентов были различными: вермикулит и торф (1:1) [17], перлит и торф (1 : 8) [24], вермикулит и почвенный грунт (1 : 1) [34], торф и речной песок (1:1) [14], сфагнум и перлит (4 : 1) [32]. В качестве емкостей для субстратов использовались пластиковые горшки и контейнеры. Помимо своевременного полива, емкости с субстратом иногда переносили в контейнеры с водой (глубина 1.5 см) и накрывали прозрачным целлофаном. Температуру для акклиматизации папоротников поддерживали в диапазоне 20–30°C. Выживаемость спорофитов всегда была достаточно высокая, например, для *A. delavayi* она достигала 80% [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование системы размножения папоротников *in vitro* посредством GGB расширяет возможности использования культуры тканей и открывает новые перспективы ее применения. Основными преимуществами данной системы размножения являются: большое количество спорофитов, образующихся в расчете на один эксплант без промежуточной стадии каллусообразования; возможность влиять на количество и темпы размножения GGB; хорошая укореняемость спорофитов без дополнительных манипуляций; однородность полученных растений; возможность использовать GGB для долгосрочного сохранения

генофонда папоротников методом криоконсервации клеточных культур *in vitro*. GGB могут быть ключевым и непрерывно поставляемым материалом для размножения *in vitro* редких, декоративных, лекарственных и пищевых папоротников. Все это делает указанную систему размножения пригодной и экономически выгодной для их массового получения. Условия инициации, пролиферации и дифференциации GGB могут варьировать между видами или быть общими для нескольких видов. Тем не менее, наиболее важным фактором является состав питательной среды. Литературные данные позволяют адаптировать и модифицировать уже известные условия культивирования для конкретных видов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Регистрационный номер: 122040800086-1).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Настоящий обзор не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rahayu E.M.D., Isnaini Y., Prartosuwiryo T.N. Induction of sporophyte formation on prothallus mass of the golden chicken fern (*Cibotium barometz*) *in vitro* // Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon. 2015. V. 1. P. 814. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010425>
2. Ballesteros D., Pence V.C. Fern conservation: spore, gametophyte, and sporophyte *ex situ* storage, *in vitro* culture, and cryopreservation // Current Advances in Fern Research. 2018. P. 227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_11
3. Шелихан Л.А., Некрасов Э.В. Размножение папоротников посредством спор в культуре *in vitro* (обзор литературы) // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2018. Вып. 20. С. 23. <https://doi.org/10.17581/bbgi2003>
4. Adebisi A.O., Oyeyemi S.D., Tedela P.O., Ojo V.I. GC-MS analysis of bioactive compounds from n-hexane leaf extract of a tropical fern, *Nephrolepis cordifolia* (L) C. Presl. // EAS J. Biotechnol. Genet. 2019. V. 1. P. 118. https://www.easpublisher.com/media/features_articles/EASJBG_15_118-123.pdf
5. Chettri U., Kumari S., Chettri B. A review on anti-microbial and hepatoprotective properties of himalayan wild fern *Nephrolepis cordifolia* (Pani Amla) // Pharma Innovation. 2020. V. 9. P. 572.
6. Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W.H., Cai Y., Kennelly E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic // Nature. 2001. V. 409. P. 579. <https://doi.org/10.1038/35054664>
7. Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species // New Phytol. 2002. V. 156. P. 27. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00493.x>
8. Trotta A., Mantovani M., Fusconi A., Gallo C. *In vitro* culture of *Pteris vittata*, an arsenic hyperaccumulating fern, for screening and propagating strains useful for phytoremediation // Caryologia. 2007. V. 60. P. 160. <https://doi.org/10.1080/00087114.2007.10589566>
9. Малюта О.В., Гончаров Е.А. Биоиндикация в условиях радиоактивного загрязнения // Вестник МПГТУ. 2008. № 1. С. 80.
10. Hansa J., Chakraborty B., Laskar B.A., Behera S.K., Patel A.K. *Pteris vittata* propagation through different exposure of chromium concentration: an experiment to comprehend phytoremediation properties // Adv. Biores. 2013. V. 4. P. 43.
11. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). МПР РФ; Росприроднадзор; РБО; МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва: Т-во науч. изд. КМК, 2008. с. 855. <http://oopt.aari.ru/ref/38>
12. Красная книга Амурской области: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. 2-е изд. Благовещенск: Изд-во ДальГАУ, 2020. 499 с. <http://www.amurohota.ru/files/RedBookAmur2020.pdf>
13. Higuchi H., Amaki W., Suzuki S. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl. // Sci. Hortic. 1987. V. 32. P. 105. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(87)90021-5)
14. Wang Z., Sun L., Wu C., Shi Y. Study on GGB tissue culture domestication technology and transplanting acclimatization in *Pteridium aquilinum* L. Kuhn // Rain Fed Crops. 2016. Is.1. P. 27. http://caod.oriprobe.com/articles/48966325/Study_on_GGB_Tissue_Culture_Domestication_Technology_and_Transplanting.htm
15. Higuchi H., Amaki W. Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation // Sci. Hortic. 1989. V. 37. P. 351. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90146-5)
16. Amaki W., Higuchi H. A possible propagation system of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum* and *Rumohra* (Arachniodes) through tissue culture // Acta Hortic. 1992. V. 300. P. 237. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.300.33>
17. Liao Y.K., Wu Y.H. *In vitro* propagation of *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. via green globular body initiation // Bot. Stud. 2011. V. 52. P. 455.
18. Johari D., Singh A.P. Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns // Current Advances in Fern Research. 2018. P. 75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_4
19. Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A. Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro* // Current Advances in Fern Research. 2018. P. 99. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_5
20. Shin S.L., Lee C.H. Medium composition affecting *in vitro* plant regeneration and acclimation of *Pteris cretica* 'Wilsonii' // Korean J. Plant Res. 2009. V. 22. P. 394. https://www.researchgate.net/publication/264032686_Medium_Composition_Affecting_In_Vitro_Plant

- Regeneration_and_Acclimation_of_Pteris_cretica_Wilsonii'
21. Camloh M., Gogala N., Rode J. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum in vitro* // Sci. Hortic. 1994. V. 56. P. 257. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)90007-8)
 22. Thakur R.C., Hosoi Y., Ishii K. Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro – an edible fern // Plant Cell Rep. 1998. V. 18. P. 203. <https://doi.org/10.1007/s002990050557>
 23. Hagiabad M.S., Hamidoghli Y., Gazvini R.F. Effects of different concentrations of mineral salt, sucrose and benzyladenine on Boston fern (*Neprolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis) runner tips initiation // J. W. S. S.-Isf. Univ. Technol. 2007. V. 11. P. 137.
 24. Yu R., Li F., Wang G., Ruan J., Wu L., Wu M., Yang C., Shan Q. *In vitro* regeneration of the colorful fern *Pteris aspericaulis* var. tricolor via green globular bodies system // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2021. V. 57. P. 225. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10059-y>
 25. Yu R., Zhang G., Li H., Cao H., Mo X., Gui M., Zhou X., Jiang Y., Li S., Wang J. *In vitro* propagation of the endangered tree fern *Cibotium barometz* through formation of green globular bodies // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2017. V. 128. P. 369. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1116-0>
 26. Шелихан Л.А. Влияние различных концентраций сахарозы на формирование зеленых глобулярных тел (GGB) у *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels *in vitro* // Труды Международной научной конференции, посвященной 140-летию Сибирского ботанического сада Томского государственного университета “Ботанические сады как центры изучения и сохранения флоразнообразия”. Томск. 2020. С. 210. <https://doi.org/10.17223/978-5-94621-956-3-2020-67>
 27. Mosonyi I.D., Tilly-Mandy A., Stefanovits-Banyai E. Growing *Spathiphyllum in vitro*: evaluation of some combinations of carbohydrate sources and minerals in the media regarding peroxidase enzyme activity and chlorophyll content // Acta Hortic. 2012. V. 961. P. 279. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.36>
 28. Tzatzani T.T., Dimassi-Theriou K., Yupsanis T., Bosabalidis A., Therios I., Sarropoulou V. Globular body production, their anatomy, DNase gel analysis and NDP kinase activity in root tips of *Poncirus trifoliata* L. // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 71. P. 247. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.023>
 29. Wu Q., Zhang C., Yang H., Hu J., Zou L. *In vitro* propagation via organogenesis and formation of globular bodies of *Salvia plebeia*: a valuable medicinal plant // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2022. V. 58. P. 51. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10223-y>
 30. Zhang G., Su W. *In vitro* rapid propagation from young leaf of *Sinephropteris delavayi* (Franch.) Mickel. // J. Yunnan Univ. Nat. Sci. 2002. V. 24. P. 234. <http://www.yndxxb.ynu.edu.cn/yndxxbzkxb/article/id/1328>
 31. Amaki W., Kadokura S. Micropropagation of *Diplazium nipponicum* // Proc. of the International Plant Propagators Society. 2009. V. 59. P. 123.
 32. Chan-Sanchez T.J., Villanueva-Couoh E., Pinzon-Lopez L., Cristobal-Alejo J. Micropropagation of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. // XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancun, Mexico. 2013. <https://smdbb.mx/congresos%20smdbb/cancun13/TRABAJOS/SMBB/BiotecnologiaAgricolaVegetal/II-O19.pdf>
 33. Li X., Fang Y.H., Han J.D., Bai S.N., Rao G.Y. Isolation and characterization of a novel somatic embryogenesis receptor kinase gene expressed in the fern *Adiantum capillus-veneris* during shoot regeneration *in vitro* // Plant Mol. Biol. Rep. 2015. V. 33. P. 638. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0769-2>
 34. Li X., Han J.D., Fang Y.H., Bai S.N., Rao G.Y. Expression analyses of embryogenesis-associated genes during somatic embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. *in vitro*: new insights into the evolution of reproductive organs in land plants // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 658. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00658>
 35. Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1996. V. 44. P. 261. <https://doi.org/10.1007/BF00048534>
 36. Kromer K., Raj A., Zolnierz L., Poturala D. Propagation *in vitro* and *ex situ* cultivation of *Woodsia alpina* (Bolton) // Club Mosses, Horsetails and Ferns in Poland – Resources and Protection / S.F. Gray. Polish Botanical Society Institute of Plant Biology, University of Wroclaw. 2008. P. 15.
 37. Shin S.L., Cheol H.L. Effect of medium components and culture methods on shoots regeneration from *Athyrium niponicum* // Korean J. Plant Res. 2011. V. 24. P. 113. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2011.24.2.113>
 38. Li T., Xu L., Li Z., Panis B. Cryopreservation of *Neotopteris nidus* prothallus and green globular bodies by droplet-vitrification // Cryo-Lett. 2013. V. 34. P. 481.
 39. Pence V.C. Propagation and cryopreservation of *Asplenium scolopendrium* var. americanum, the American hart's-tongue fern // Am. Fern J. 2015. V. 105. P. 211. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-105.3.211>
 40. Fernandez H., Bertrand M., Sanchez-Tames R. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes // Sci. Hortic. 1997. V.68. P. 243. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00986-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00986-7)
 41. Bertrand A.M., Albuerne M.A., Fernandez H., Gonzalez A., Sanchez Tames R. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1999. V. 57. P. 65. <https://doi.org/10.1023/A:1006348628114>
 42. Prematilake D.P., Nanayakkara N.H.A.G.R., Hettiarachchi A. Rapid propagation of *Nephrolepis* fern via tissue culture of runner tips // Ann. Sri Lanka Depart. Agric. 2004. V. 6. P. 321. <http://doan.nsf.ac.lk/handle/1/2077>

43. Liao Y.K., Cheng C.T. Using homogenized green globular body in tissue culture propagation of *Platycerium willinckii* T. Moore and *Platycerium grande* J. Sm. // Crop, Environ. Bioinf. 2018. V. 15. P. 169.
[https://doi.org/10.30061/CEB.201809_15\(3\).0003](https://doi.org/10.30061/CEB.201809_15(3).0003)
44. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
45. Raine C.A., Sheffield E. Establishment and maintenance of aseptic culture of *Trichomanes speciosum* gametophytes from gemmae // Am. Fern J. 1997. V. 87. P. 87.
<https://doi.org/10.2307/1547268>
46. Iuchi M., Goto A., Kawamura H. Micropropagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. through tissue culture, II: Induction of green globular bodies and regeneration of plantlets. // Tokushima Agric. Exp. Stat. Rep. (Japan). 1999. V. 35. P. 14.
47. Yu R., Li Y., Li D., Zhan X., Shi L. Radiosensitivity of green globular bodies of *Matteuccia struthiopteris* exposed to $^{60}\text{Co}\gamma$ radiation // Chin. Bull. Bot. 2015. V. 50. P. 565.
<https://doi.org/10.11983/CBB14141>
48. Wang D., Li Y., Li D., Shi L. Green globular body (GGB) induction and differentiation in the medicinal fern *Drynaria roosii* // BMC Plant Biology. 2021.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-409651/v1>
49. Yu R., Wang D., Li D., Zhan X., Shi L. Radiation breeding of Boston Fern via $^{60}\text{Co}\gamma$ rays. // Acta Horticulturae Sinica. 2018. V. 45. P. 988.
<https://www.ahs.ac.cn/EN/Y2018/V45/I5/988>