

16. *Hinrichsen J., Hatterman-Valenti H.* Serviceberry biotypes in North Dakota: new woody edible ornamental trials // *Acta Horticulturae*. – 2018. – 1191. – P. 53-58.
17. *Hunková J., Libiaková I. G., Fejér J., Gajdošová A.* Improved *Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. ex M. Roem. shoot proliferation by manipulating iron source // *Propagation of Ornamental Plants*. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 103-107.
18. *Lloud G., McCown B.* Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* – 1980. – Vol. 30. – P. 420-427.
19. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.
20. *Pruski K., Nowak J., Grainger G.* Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* NUTT.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1990. – Vol. 21. – P. 103-109.
21. *Quoirin M., Lepoivre P.* Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. // *Acta Horticulturae*. – 1977. – V. 78. – P. 437-442.
22. The Plant List. Version 1.1., 2013.

Статья поступила в редакцию 09.04.2020 г.

Raeva-Bogoslovskaya E.N., Molkanova O.I. Some features of clonal micropropagation of decorative cultivars of *Amelanchier* Medik. // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2020. – № 135. – P. 97-104.

In vitro culture conditions were optimized for representatives of the genus *Amelanchier* Medik. at the stages of micropropagation and rooting. A significant effect of the mineral and hormonal compositions of culture media on the morphogenetic potential of the cultivars of serviceberry has been established. The use at the stage of micropropagation of the MS culture medium with addition 1,0 mg / L 6-benzylaminopurine (6-BAP) promoted the active microshoot regeneration of the studied genotypes. For the induction of rhizogenesis the type of auxin as IBA at a concentration of 1,0 mg / L was used.

Keywords: *Amelanchier* Medik.; *in vitro*; mineral composition of the culture medium; growth regulators; morphogenetic potential

УДК 631.523:634.1:635.9

DOI: 10.36305/0513-1634-2020-135-104-111

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ СПОРОФИТОВ *OSMUNDA REGALIS* L. *IN VITRO*

**Валентина Ивановна Маляровская, Руслан Султанович Рахмангулов,
Наталья Григорьевна Конинская**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»
354002, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса 2/28
E-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Одним из значимых этапов для размножения редкого исчезающего папоротника *Osmunda regalis* L. посредством спор в культуре *in vitro* является регенерация спорофитов из гаметофитов. В статье показано, что эффективное образование спорофитов *O. regalis* наступало раньше (через 60 суток) и в большем процентном отношении (51,6%) на питательной среде с меньшим содержанием солей ½ МС, а

исключение нитрата аммония и витаминов из среды значительно усиливало рост спорофитов, по сравнению с другими вариантами сред и контролем.

Ключевые слова: папоротник; исчезающий вид; питательные среды; развитие спорофитов; культура *in vitro*

Введение

Методы биотехнологии широко используются для сохранения и размножения редких и исчезающих видов природной флоры [3-5], в том числе и для папоротников [9]. Деграция и уничтожение местообитаний папоротников в результате изменения климата и деятельности человека ведет к сокращению численности и исчезновению их популяций, нанося невосполнимый ущерб биологическому разнообразию растений [6]. Среди видов, находящихся в критическом состоянии многолетний папоротник *Osmunda regalis* L. Во всем мире популяции папоротника *O. regalis* подвержены угрозе стать редкими, количество растений неуклонно уменьшается во многих странах мира (Норвегия, Швейцария, Хорватия, Венгрия, Иран) [16]. В России этот вид внесен в Красную книгу и отнесен к категории «Находящийся под угрозой исчезновения» [2].

Известно, что для размножения папоротников *in vitro* посредством спор значимыми этапами являются: инициация прорастания спор, рост и размножение гаметофитов, рост, дифференциация и укоренение спорофитов [13, 14]. При этом важное влияние оказывают регуляторы роста, как на развитие гаметофитов, так и на образование репродуктивных органов и последующее формирование спорофитов. Так, действие кинетина (Кин) на половую дифференциацию гаметофита *O. regalis* зависело от его концентрации: низкие концентрации увеличивали долю женских гаметофитов, а высокие – уменьшали долю женских и увеличивали мужских и бесполовых гаметофитов [12]. Вместе с тем кинетин 3,0 мг/л в сочетании с 0,1 мг/л НУК может вызывать увеличение размеров гаметофита [13]. Также, для развития гаметофитов и последующего образования спорофитов необходимо учитывать физическое состояние среды и наличие свободной воды. Например, сухой вес гаметофитов *O. regalis*, культивируемых на среде с 0,35% агаром увеличивался по сравнению с более агаризованной средой, содержащей 0,7% агара [10]. Известно, что при развитии спорофита рост гаметофита обычно прекращается. Однако для разных видов в культуре *in vitro* наблюдали как прекращение роста гаметофитов, так и продолжение роста одновременно с ростом спорофита [11].

Сроки регенерации спорофитов из гаметофитов у разных видов папоротников могут варьировать в больших пределах. Образование первых спорофитов может происходить через 3 месяца, через 90–120 сут и через 180 сут [8, 18]. На срок образования спорофитов влияет состав питательной среды: для гаметофитов *Cyathea australis* (R.Br.) Domin появление спорофитов варьировало от 46 до 83 сут в зависимости от питательной среды. По данным Makowski и соавторов (2016) развитие спорофитов *O. regalis* наступало раньше на питательных средах с наименьшим содержанием солей МС (1/8 по сравнению с 1/4 и 1/2), а исключение нитрата аммония из среды значительно усиливало рост спорофитов [16]. Образование корней у спорофитов может происходить спонтанно на культуральной среде в отсутствие регуляторов роста [7, 13]. Вместе с тем, есть данные, в которых показана способность ауксинов стимулировать у папоротников корнеобразование. Так, НУК в концентрации 0,01 мг/л увеличивал количество и длину корней *Rumohra adiantiformis* (G.Forst.) Ching [7]. В тоже время оптимальным для укоренения спорофитов *Asplenium nidus* L. было их культивирование на среде с 2 мг/л индолилмасляной кислоты [15]. Таким образом, условия на этапах размножения в культуре *in vitro* разных видов папоротников, в том числе и *O. regalis* могут значительно различаться. Такие факторы, как состав

питательной среды и наличие или отсутствие регуляторов роста на этапе регенерации спорофитов имеют большое значение.

В связи с этим целью исследований было изучение влияния состава питательной среды на развитие спорофитов *Osmunda regalis* L. *in vitro*.

Объект и методы исследований

Исследования выполняли в отделе биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (2018-2020 гг.). Объектом исследований служили споры и спорангии *Osmunda regalis*, собранные с растений *in situ*. Сбор эксплантов осуществляли в сроки их созревания, в период с середины мая по первую декаду июня, на территории отдела ботанического сада «Дерево Дружбы» ФГБНУ ВНИИЦиСК. В работе использовали методы клонального микроразмножения основанные на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [1]

Стерилизацию спорангиев осуществляли посредством их промывания в растворе 2% перекиси водорода и нескольких капель Tween 20 (Sigma, США) в течение 10 минут. После стерилизации спорангии трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные спорангии помещали на поверхность питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [17]. Для стимуляции прорастания спор в пробирки добавляли 1-2 мл стерильной дистиллированной воды. Культивирование проводили при освещенности 3000 лк, температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и фотопериоде 16 часов.

Полученные через 4 месяца из спор гаметофиты *O. regalis* (рис. 1, 2), были использованы в эксперименте для изучения влияния состава питательной среды на развитие спорофитов папоротника.



Рис. 1 Кластеры гаметофитов *Osmunda regalis* на первичной среде МС, через 4 месяца культивирования.



Рис. 2 Удлиненные гаметофиты *Osmunda regalis*

В эксперименте применяли следующие варианты питательных сред: контроль – питательная среда МС; Вариант 1 – $\frac{1}{2}$ МС (без NH_4NO_3 и витаминов); Вариант 2. – $\frac{1}{2}$ МС, 0,1 мг/л нафтилуксусная кислота (НУК, Sigma, США); Вариант 3 – $\frac{1}{2}$ МС.

Регуляторы роста и витамины вводили в среды в стерильных условиях ламинарного бокса после автоклавирования. Гаметофиты папоротника культивировали в условиях культурального помещения при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде, освещенности 3000 лк. Опыты проводили трижды в пятикратной повторности. При этом учитывали биометрические показатели развития спорофитов и гаметофитов в процессе культивирования *in vitro*. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием программы Statistica for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты и обсуждение

В результате исследований, установлено что сроки регенерации ювенильных спорофитов из гаметофитов *O. regalis* зависели от состава питательной среды и варьировали от 60 до 180 сут (рис. 3, 4). Наиболее раннее появление спорофитов (через 60 сут) было отмечено на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС без NH_4NO_3 и витаминов (51,6%). Через 120 сут отмечено единичное образование спорофитов на среде $\frac{1}{2}$ МС с содержанием регулятора роста НУК в концентрации 0,1 мг/л (11,6%). Более позднюю (через 180 сут) регенерацию спорофитов из гаметофитов наблюдали на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС (1,2%). На контрольной среде МС образования спорофитов не отмечено. Очевидно, что питательная среда, не содержащая NH_4NO_3 и витаминов, стимулировала развитие наибольшего количества спорофитов. На этой же среде при развитии спорофитов рост гаметофитов прекращался.

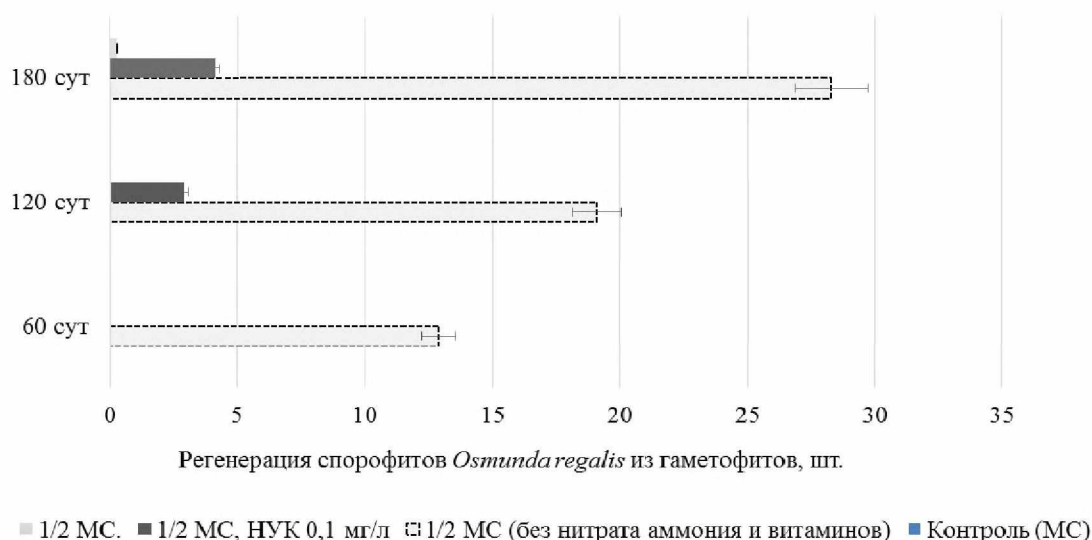


Рис. 3 Количество спорофитов *O. regalis*, шт. (через 60, 120 и 180 суток культивирования) (НСР_{0,5}=3,7)



а б в г
Рис. 4 Развитие гаметофитов и спорофитов *O. regalis* через 90 сут культивирования: а – на питательной среде МС (контроль); б – $\frac{1}{2}$ МС (без NH_4NO_3 и витаминов); в – $\frac{1}{2}$ МС, 0,1 мг/л НУК; г – $\frac{1}{2}$ МС

Количество и длина гаметофитов *O. regalis* на протяжении всего периода культивирования (без субкультивирования) на всех вариантах питательных сред за исключением контроля увеличивалась (таблица). Существенных различий по этим показателям между вариантами не отмечено ($\text{НСР}_{0,5} = 0,3$).

В то же время, по количеству и высоте побегов спорофитов различия между вариантами были существенны ($\text{НСР}_{0,5}$ – 0,7 и 0,5, соответственно). Наибольшие биометрические показатели отмечены на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС без NH_4NO_3 и витаминов ($2,5 \pm 0,30$ и $1,7 \pm 0,02$, соответственно). Необходимо также отметить, что только на этом варианте среды без регуляторов роста наблюдали спонтанное образование корней у спорофитов (рис. 5).



Рис. 5 Спорофиты *O. regalis* с корневой системой через 180 сут культивирования

Наименьшее количество и высота побегов спорофитов были отмечены на среде $\frac{1}{2}$ МС ($0,1 \pm 0,01$ и $0,2 \pm 0,01$, соответственно). В контроле регенерацию спорофитов на протяжении всего периода эксперимента не наблюдали.

Таблица

Влияние состава питательной среды на биометрические показатели спорофитов из гаметофитов, полученных из спор *O. regalis* (через 180 сут культивирования)

Вариант	Количество гаметофитов, шт./эксплант	Длина гаметофитов, см	Основные показатели спорофитов			
			Количество корней, шт.	Длина корней, см	Количество побегов, шт.	Высота побегов, см
Контроль (МС)	1,1±0,01	0,6±0,10	0	0	0	0
½ МС (без NH ₄ NO ₃ и витаминов)	7,3±1,02	0,9±0,10	3,1±0,20	2,9±0,20	2,5±0,30	1,7±0,02
½ МС, 0,1 мг/л НУК	7,8±1,23	1,2±0,20	0	0	0,2±0,01	0,5±0,01
½ МС	8,9±1,34	1,3±0,30	0	0	0,1±0,01	0,2±0,01

Таким образом, регенерация спорофитов *O. regalis* наступала раньше и в большем количестве на питательной среде с наименьшим содержанием солей МС (½ нормы по сравнению с полной МС), а исключение нитрата аммония и витаминов из среды значительно усиливало рост спорофитов. Поскольку количество спорофитов в этих условиях культивирования увеличилось более чем в восемь раз, можно предположить, что солевое голодание может играть ключевую роль в индукции спорофитов, тогда как нитрат аммония ингибирует этот процесс. Этого предположения придерживаются и другие исследователи [11, 16]. Есть данные, что регуляторы роста участвуют в процессах развития, включая половую экспрессию у гаметофитов и регенерацию спорофитов *O. regalis* [12]. Однако наше исследование показало, что образование спорофитов может происходить на средах, не содержащих регуляторов роста. Вместе с тем полученные нами результаты согласуются с результатами, представленными другими авторами, которые установили, что, образование корней у спорофитов может происходить спонтанно на культуральной среде в отсутствие регуляторов роста [7, 13].

Выводы

Выявлено влияние состава питательной среды на этапе регенерации спорофитов из гаметофитов *in vitro* редкого исчезающего папоротника *Osmunda regalis*. Установлено, что эффективное образование спорофитов *O. regalis* наступало раньше на 60-120 сут на питательной среде с уменьшенным в два раза содержанием солей – ½ МС и без нитрата аммония и витаминов. Показано, также, что на оптимальном составе питательной среды наибольшие биометрические показатели спорофитов (количество и длина корней, количество и высота побегов) были достоверно выше, чем в контроле и других вариантах сред. Описанная в статье система массового получения спорофитов папоротника *O. regalis in vitro* на безгормональной среде с эффективностью может быть использована для восстановления популяций находящегося под угрозой исчезновения в регионе произрастания вида папоротника.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 158 с.
2. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы / отв. ред. С.А. Литвинская. – Изд. 2-е. – Краснодар: Дизайн Бюро, 2007. – 639 с.

3. *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
4. *Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Кузьмина Т.Н., Никифоров А.Р., Иванова Н.Н., Лесникова-Седошенко Н.П.* Регенерация *Lamium glaberrimum* (К. Koch) Taliev через прямой и непрямой органоогенез *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2018. – Вып. 129. С. 23-29. <http://dx.doi.org/10.25684/NBG.boolt.129.2018.03>
5. *Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Никифоров А.Р., Лесникова-Седошенко Н.П., Челомбит С.В.* Биотехнологические подходы в размножении редкого эндемика флоры горного Крыма *Scrophularia exilis* Popl. // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2018 – Вып. 127. С. 59-67. <https://doi.org/10.25684/NBG.boolt.127.2018.08>
6. *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. 23–42. doi: 10.17581/bbgi2003
7. *Avila-Perez M.C.R., White-Olascoaga L., Arzate-Fernandez A.M.* *In vitro* regeneration of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis* (G.Forst.) Ching) // Amer. Fern J. – 2011. – 101. – 25–35. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-101.1.25>
8. *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. <https://doi.org/10.3103/s0095452718020032>
9. *Bharati S.K., Dutta Choudhury M., Mazumder B.P.* *In vitro* propagation in *Pteridophytes*: a review // Intl. J. Res. Ayurveda Pharm. – 2013. – 4. – 297–303.
10. *Fernández H., Bertrand A.M., Sánchez-Tamés R.* Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis* // Plant Cell Rep. – 1997. – 16. – 358-362 <https://doi.org/10.1007/BF01088297>
11. *Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R.* Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication // Plant Cell Tissue and Organ Cult. – 1999. – 56(3). – 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1006277229136>
12. *Greer G.K., Dietrich M.A., DeVol J.A., Rebert A.* The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* gametophytes // Amer. Fern J. – 2012. – 102(1). – 32–46. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-102.1.32>
13. *Haddad S., Bayerly R.* *In vitro* propagation of ferns (*Asplenium nidus*) via spores culture // Jord. J. Agricult. Sci. – 2014. – 10(1). – 144–153. <https://doi.org/10.12816/0029880>
14. *Johari D., Singh A.P.* Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns. In: Current advances in fern research. Cham, Switzerland. 2018. 75–97 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_4
15. *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
16. *Makowski D., Tomiczak K., Rybczyński J.J., Mikula A.* Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. // Acta Physiol Plant. – 2016. – 38. – 19 <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2037-y>
17. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – 15. – 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

18. xRybczynski 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 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_5

Simoes-Costa M.C., Moura I.R., Silva M.J., Duarte M.C. *In vitro* culture of spores from *Woodwardia fimbriata* Smith // Acta Hort. – 2015. – 1083. – 281–285. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.35>

Статья поступила в редакцию 30.04.2020 г.

Malyarovskaya V.I., Rakhmangulov R.S., Koninskaya N.G Influence of the composition of the culture media on the development of sporophytes *Osmunda regalis* L. *in vitro* // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2020. – № 135. – P. 104-111.

One of the important stages for the propagation of the rare endangered fern *Osmunda regalis* L. through spores is the regeneration of sporophytes from gametophytes at *in vitro* culture. The article shows that the effective formation of *O. regalis* sporophytes occurred earlier (after 60 days) and in a larger percentage (51.6%) on a culture medium with a lower salt content ½ MS, and the exclusion of ammonium nitrate and vitamins from the medium is significantly enhanced the growth of sporophytes, compared with other variants of media and control.

Keywords: fern; endangered species; culture media; development of sporophytes; *in vitro* culture

ПЛОДОВОДСТВО

УДК 574.2

DOI: 10.36305/0513-1634-2020-135-111-118

НОВЫЙ ПОДХОД К СТАБИЛИЗАЦИИ ПРОДУКЦИОННОГО ПРОЦЕССА СОРТОВ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ ФЛУКТУАЦИИ КЛИМАТА

**Ирина Александровна Драгавцева, Анна Павловна Кузнецова,
Анна Васильевна Клюкина**

ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия», 350072, Краснодарский край, г. Краснодар,
ул. 40-летия Победы, 39
E-mail: I_d@list.ru

Стабильность плодоношения плодовых культур зависит от воздействия на них природных факторов среды, в первую очередь климатических. Для плодовых культур (особенно косточковых) наиболее губительными оказались отрицательные температуры воздуха в зимне-весенний период, которые были выявлены при выполнении данных исследований. С целью разработки нового подхода к стабилизации продукционного процесса плодовых культур в условиях флуктуации климата проведена оценка адаптации растений двух сортов персика (Золотой Юбилей и Ветеран) в различных экологических зонах садоводства (Прикубанская и Западная предгорная Краснодарского края) в течение двух длительных периодов (1985-2000 гг. и 2001-2020 гг.), охватывающих изменения климата. Новый подход предусматривает оценку продукционного процесса растений исследуемых сортов по проявлению их адаптаций к низким температурам воздуха в зимне-весенний период в конкретные фазы онтогенеза с учетом флуктуации климата. Разработана матрица устойчивости цветковых почек, изучаемых сортов персика, по каждой фазе зимне-весеннего развития. Установлена вероятность проявления стрессовых температур, губящих их урожай за два длительных периода лет с учетом изменения климата. Выявлены наиболее уязвимые периоды наступления температурных стрессов для сортов персика в различных зонах садоводства. Показана смена рангов их адаптации к губительным температурам зимне-весеннего периода (во времени и пространстве). Даны предложения по корректировке рационального размещения сортов