НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ботанические сады как центры изучения и сохранения фиторазнообразия

Труды Международной научной конференции, посвященной
140-летию Сибирского ботанического сада
Томского государственного университета

Томск, 28–30 сентября 2020 г.

Томск
Издательство Томского государственного университета
2020

Влияние различных концентраций сахарозы на формирование зеленых глобулярных тел (GGB) у *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels *in vitro*

Л.А. Шелихан

Амурский филиал Ботанического сада-института ДВО РАН, Благовещенск, Россия, solecito91@mail.ru

Аннотация. Размножение папоротников посредством зеленых глобулярных тел (green globular bodies, GGB) в условиях *in vitro* позволяет получить большое количество спорофитов. В этом исследовании в качестве эксплантов были использованы молодые спорофиты *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels полученные *in vitro*. Экспланты помещали на питательную среду 1/2 Мурасиге-Скуга без добавления нитрата аммония, витаминов и регуляторов роста, дополненную 0,8 % агара. Для оценки влияния сахарозы на формирование GGB были использованы следующие концентрации: 0; 0,5; 1,5; 2 и 3 %. После 1 месяца в культуре *in vitro* проводили подсчет GGB. Формирование GGB отмечено на всех средах. Наиболее активная инициация GGB обнаружена на средах с 2 % сахарозы. Без добавления сахарозы (0 %) число сформированных GGB было низким. Однако скорость регенерации спорофитов была выше на среде с 0 % сахарозы, чем на среде с 2% сахарозы.

Ключевые слова: папоротник, *Polystichum craspedosorum*, *in vitro*, сахароза, размножение, зеленые глобулярные тела, GGB, спорофит.

Effect of different concentrations of sucrose on the formation of green globular bodies (GGB) of *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels *in vitro*

L.A. Shelikhan

Amur Branch of the Botanical Garden-Institute FEB RAS, Blagoveshchensk, Russia, solecito91@mail.ru

Abstract. *In vitro* propagation of ferns through formation of green globular bodies (GGB) allows to obtain a large number of sporophytes. In this study, young sporophytes of *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels grown *in vitro* were used as explants. The explants were placed on the 1/2 Murashige and Skoog's medium, ammonium nitrate-free, vitamin-free and growth regulators-free, supplemented with 0.8 % agar. The following concentrations were used to estimate the effect of sucrose on the formation of GGB *in vitro*: 0, 0.5, 1.5, 2, 3 %. After 1 month of cultivation, the number of GGB was calculated. The formation of GGB is noted in all concentrations of sucrose. The most active GGB initiation was observed in the medium with 2 % sucrose. In the absence of sucrose (0 %) the number of GGB formed was the lowest. However, the rate of sporophyte regeneration was higher in the medium with 0 % sucrose than in the medium with 2 % sucrose.

Key words: fern, *Polystichum craspedosorum*, *in vitro*, sucrose, propagation, green globular bodies, GGB, sporophyte.

Polystichum craspedosorum (Maxim.) Diels или Многорядник укореняющийся в настоящее время находится под угрозой исчезновения на территории Амурской области, внесен в новую редакцию Красной книги региона (2019). Этот вид внесен в Красные книги Хабаровского края (2008) и Еврейской автономной области (2006). Одним из перспективных путей сохранения и размножения папоротников признан метод размножения в условиях *in vitro* (Шелихан, Некрасов, 2018). Использование этого метода может служить дополнением к классическому способу сохранения *P. craspedosorum* (Крещенок, 2011; Крещенок, Храпко, 2018). Использование спор в качестве эксплантов, дальнейшее культивирование гаметофитов и получение первичных спорофитов было рассмотрено ранее (Shelikhan, 2020). Одним из вариантов ускоренного размножения папоротников в условиях *in vitro* стало использование GGB (Higuchi et al., 1987; Higuchi, Amaki, 1989; Camloh, Ambrozic-Dolinsek, 2011). Термин GGB (от англ. green globular bodies – зеленые глобулярные тела) впервые был введен Хигучи и его коллегами (1987). Для получения таких структур нужны молодые спорофиты. В качестве эксплантов для образования GGB принято использовать сегменты вай, стебля, корня или отделенное основание побега. Формирова-

ние GGB, в зависимости от вида папоротника, обычно возможно на средах с добавлением регуляторов роста и без них (Camloh, Ambrozic-Dolinsek, 2011). Каждое полученное зеленое глобулярное тело впоследствии формирует либо новый дочерний спорофит, либо на его основе начинают формироваться новые GGB. Такой вариант вегетативного размножения в условиях *in vitro* позволяет получить большое количество спорофитов.

Целью этой работы было исследование влияния различных концентраций сахарозы на формирование GGB у *P. craspedosorum* в условиях *in vitro*.

В качестве эксплантов использовали молодые спорофиты, полученные ранее в условиях *in vitro* (Shelikh, 2020). С этих спорофитов скальпелем удаляли вайи и корни. Оставшиеся точки роста (основания побегов) помещали на среду 1/2 Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962) без добавления нитрата аммония, витаминов и регуляторов роста, дополненную 0,8 % агар, pH доводили до 5,8 (Makowski et al., 2016). Были использованы 5 вариантов концентрации сахарозы в культуральной среде: 0; 0,5; 1,5; 2 и 3 %. Период наблюдения в культуре *in vitro* составил 1 месяц при 16/8 фотопериоде, после чего были произведены расчеты. Для подсчета использовали формулу: скорость регенерации спорофитов = (количество GGB с развивающимися спорофитами / количество GGB) × 100 (Liao, Wu, 2011). Подсчеты проводили под бинокуляром Nikon SMZ645.

Образование GGB наблюдали на всех использованных вариантах сред (таблица, рис. 1). GGB представляли собой плотную зеленую массу. Иногда одиночные GGB были плохо различимы, их с трудом можно было отделить в период развития. Тем не менее, области меристемы были видны на поверхности и представляли собой сферические зачатки спорофитов с бледно-коричневыми ризоидами на нижней стороне. В процессе развития (созревания) GGB и образования нового спорофита они легче отделялись от остальной массы. Наиболее активная инициация GGB была отмечена на средах с 2 % сахарозы (20,2 шт./эксплант) (таблица). В варианте без добавления сахарозы (0 %) число сформированных GGB было наименьшим (5,2 шт./эксплант) (таблица). Число GGB в вариантах с 0,5 %, 1,5 % и 3 % сахарозы было примерно на одном уровне (12,4; 14 и 13,8 шт./эксплант). Таким образом, показанные выше концентрации сахарозы не являются лимитирующим фактором для образования GGB на культуральной среде. Однако концентрация добавляемой сахарозы может оказывать влияние на их количественные значения, поэтому подходящим вариантом для инициации образования GGB было добавление в среду 2 % сахарозы.

Число GGB после 1 месяца культивирования на питательной среде 1/2 MS без добавления нитрата аммония, витаминов и регуляторов роста, дополненную 0,8% агар, pH 5,8 с разным количеством сахарозы. Показаны средние значения для 5 эксплантов ± стандартное отклонение (S.D.)

Концентрация сахарозы	0 % сахароза	0,5 % сахароза	1,5 % сахароза	2 % сахароза	3 % сахароза
Количество GGB	5,2±3,6	12,4±1,8	14±7,5	20,2±6,5	13,8±4,3
Количество GGB с развивающимися спорофитами	2,4±1,9	4,2±3,3	2,2±1,5	4,2±3,19	1,8±1,3
Скорость регенерации спорофитов (%)	46,2	33,9	15,7	20,8	13,0

Рис. 1. Группа GGB, стрелкой отмечен одиночный GGB. Шкала 1 мм

Рис. 2. Развивающиеся спорофиты из GGB. Шкала 1 мм

Подсчет числа сформированных спорофитов из GGB (рис. 2) также показал, что наиболее благоприятной концентрацией сахарозы было 2 %. Однако скорость регенерации спорофитов, согласно формуле (Liao, Wu, 2011) была выше на среде с 0 % сахарозы (46,2 %), чем на среде с 2 % сахарозой (20,8 %). Согласно экспериментам зарубежных ученых (Camloh, Ambrozic-Dolinsek, 2011), чем активнее спорофиты начинают расти, тем меньше формируются GGB. Поэтому в зависимости от цели работы, можно использовать как варианты культуральной среды с 2 % сахарозой, так и вариант без добавления сахарозы (0 %). Следует отметить, что во всех вариантах после 1 месяца культивирования, размеры молодых вай не превышали в среднем 0,26 см. Тем не менее, все спорофиты полученные во всех вариантах подходили для посадки на стерилизованный почвенный субстрат, поскольку имели корневую систему.

ЛИТЕРАТУРА

- Воронов Б.А. Красная книга Хабаровского края: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных. Хабаровск: Приамурские ведомости, 2008. 632 с.
- Креценко И.А. Выращивание растений рода Многорядник (*Polystichum*) из спор // Региональные проблемы. 2011. Т. 14, № 1. С. 30–32.
- Креценко И.А., Храпко О.В. *Polystichum craspedosorum*: вопросы охраны генофонда // Растения в муссонном климате: антропогенная и климатогенная трансформация флоры и растительности: материалы VIII всероссийской научной конференции (Благовещенск, 18–21 сентября 2018 г.). Благовещенск: Изд-во ДальГАУ, 2018. С. 98–101.
- Рубцова Т.А. Красная книга Еврейской автономной области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Новосибирск: АРТА, 2006. 247 с.
- Сенчик А.В. Красная книга Амурской области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. Благовещенск: Изд-во ДальГАУ, 2019. 499 с.
- 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.
- Camloh M., Ambrozic-Dolinsek J. *In vitro* regeneration systems of *Platycerium* / Fernandez H., Kumar A., Revilla M.A. // Working with Ferns: Issues and Applications. Springer Science and Business Media. New York, 2011. P. 111–125.
- Higuchi H., Amaki W., Suzuki S. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl // Scientia Horticulturae. 1987. Vol. 32. P. 105–113.
- Higuchi H., Amaki W. Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation // Scientia Horticulturae. 1989. Vol. 37, iss. 4. P. 351–359.
- Liao Y.K., Wu Y.H. *In vitro* propagation of *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. via green globular body initiation // Botanical Studies. 2011. Vol. 52. P. 455–463.
- Makowski D., Tomiczak K., Rybczynski J.J., Mikula A. Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. // Acta Physiologiae Plantarum. 2016. Vol. 38. P. 1–12.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- Shelikhhan L.A. *In vitro* culture of the rare fern *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels. // Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation. 2020. Vol. 9, is. 1. P. 91–95.