

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПОР РЕДКИХ И ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПАПОРОТНИКОВ РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

И.А. Крещенок<sup>1</sup>, С.В. Нестерова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Амурский филиал Учреждения Российской академии наук Ботанического сада-института Дальневосточного отделения РАН, 675000, Благовещенск, 2-й км Игнатьевского шоссе, e-mail: garden@ascnet.ru, ikreshhenok@yandex.ru

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения РАН, 690024, Владивосток, ул. Маковского, 142, e-mail: office@bgi.dvo.ru, svnesterova@rambler.ru

Приведены результаты исследования влияния криоконсервации (–196 °С) на всхожесть спор 12 видов папоротников. Полученные данные позволили рассмотреть криоконсервацию как перспективный метод длительного хранения спор изучаемых видов.

**Ключевые слова:** криоконсервация, споры, папоротники, жидкий азот, Дальний Восток России.

## CRYOPRESERVATION OF SPORES OF RARE AND ECONOMIC-VALUABLE FERNS OF THE RUSSIAN FAR EAST

I.A. Kreshchenok<sup>1</sup>, S.V. Nesterova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Amur Branch of Botanical Garden-Institute, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 675000, Blagoveshchensk, 2 km of Ignatevskaya Line, e-mail: garden@ascnet.ru, ikreshhenok@yandex.ru

<sup>2</sup>Botanical Garden-Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690024, Vladivostok, Makovskogo str., 142, e-mail: office@bgi.dvo.ru, svnesterova@rambler.ru

The results of research of cryopreservation of spores 12 species of ferns are presented. The cryopreservation is a perspective method of long-term storage of spores of studied species ferns.

**Key words:** cryopreservation, spores, ferns, liquid nitrogen, Russian Far East.

### ВВЕДЕНИЕ

Папоротники являются реликтовым элементом флоры Дальнего Востока России и весьма уязвимы при неблагоприятных воздействиях на их среду обитания. Активная антропогенная нагрузка на естественные биоценозы приводит к снижению числа особей и количества популяций, нарушению естественного возобновления видов. К наиболее негативным воздействиям можно отнести разработку месторождений полезных ископаемых, создание гидроэлектростанций и затопление территорий под водохранилища, вырубку леса, строительство дорог, линий электропередач и др., а также неконтролируемый сбор хозяйственно ценных видов населением для употребления в пищу и изготовления лекарственных средств. В настоящее время в Красные книги различных регионов вносится все больше видов папоротников. Так, в Красную книгу России (2008б) включено 23 вида, из которых 14 (60.9 %) произрастают на территории Дальнего Востока. В Красной книге Хабаровского края (2008б) отмечено 24 вида (в издании 2000 г. – 16 видов), для Приморского края (Красная книга..., 2008а) и Сахалинской области (Красная книга..., 2005) при-

водится по 22 вида, для Амурской (Красная книга..., 2009) и Камчатской областей (Красная книга..., 2007) по 13 видов, в Красную книгу Еврейской автономной области (2006) включено 11 папоротников.

В связи с быстрой потерей жизнеспособности спор папоротников (Арнаутова, 1988; Храпко, 1996; Гуреева, 2001; и др.) актуальна задача разработки способа их длительного хранения без снижения всхожести. Одним из современных методов хранения генетического материала является криоконсервация – замораживание в жидком азоте (–196 °С). Результаты изучения действия сверхнизких температур на споры тропических и субтропических видов папоротников показали положительное влияние криоконсервации на жизнеспособность спор (Agrawal et al., 1993; Simabukuro et al., 1998; Rogge et al., 2000; Pence, 2002; Wardlaw, 2002). Данных о долговременном хранении спор папоротников умеренной зоны немного (Науялис, Филин, 1983; Мацкевич и др., 1996; Крещенок, 2006; Pangua et al., 1999; Ballesteros et al., 2004). Эксперименты, проведенные нами ранее, позволили выявить неоднозначную реакцию спор дальневосточных папо-

ротников на сверхнизкие температуры – в некоторых случаях наблюдалось снижение всхожести (Нестерова и др., 2008; Крещенок, Нестерова, 2009; Kreshchenok, Nesterova, 2007).

Цель настоящей работы – изучение влияния криоконсервации на жизнеспособность спор редких, охраняемых и хозяйственно ценных видов папоротников российского Дальнего Востока.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили споры 12 видов папоротников. Среди них редкие и исчезающие – *Asplenium incisum* Thunb., *A. ruta-muraria* L., *Aleuritopteris argentea* (S.G. Gmel.) Fée, *Coptidopteris wilfordii* (Moore) Nakai et Momose, *Polystichum braunii* (Spenn.) Fée, *Dryopteris sichotensis* Kom. К хозяйственно ценным относятся *Pteridium japonicum* (Nakai) Tardieu-Blot et C. Chr., *Dryopteris fragrans* (L.) Schott, *D. crassirhizoma* Nakai, *D. expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy, *Athyrium monomachii* (Kom.) Kom., *A. sinense* Rupr. (Крещенок, 2007, 2008).

Споры собраны в естественных местах произрастания папоротников на территории Еврейской автономной и Амурской областей, Приморского края.

Часть свежесобранных спор помещали в бумажные пакеты и оставляли для хранения в лабораторных условиях, другую – закрывали в криопробирки и погружали в жидкий азот ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) на 120 суток. Размораживание проводили на воздухе в лаборатории при  $t = +20\dots+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Споры проращивали в чашках Петри с дистиллированной водой. Всхожесть подсчитывали с использованием бинокля МБС-10 в трех полях зрения. Контролем служила всхожесть свежесобранных спор. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Microsoft Excel.

Латинские названия видов приводятся по А.И. Шмакову (2009).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После криоконсервации всхожесть спор девяти видов папоротников осталась на уровне контроля. Достоверное повышение всхожести спор более чем на 80 и 60 % отмечалось у *Asplenium ruta-muraria* и *Aleuritopteris argentea* соответственно (см. таблицу). Устойчивость к низким и сверхнизким температурам может объясняться высоким содержанием жиров, сахаров и низкой влажностью спор – около 4 % (Гуреева, 2001; Ballesteros et al., 2004; Pence, 2008; Ballesteros, 2011).

В наших экспериментах глубокое замораживание оказало отрицательное влияние на споры *Athyrium monomachii* – всхожесть снизилась более чем на 40 %. По мнению зарубежных авторов (Pangua et al., 1999; Quintanilla et al., 2002; Ballesteros, Walters, 2007), получивших подобные результаты при изучении других видов папоротников, снижение всхожести спор после криоконсервации может быть частным случаем и объясняется высоким содержанием влаги в конкретных образцах.

Всхожесть спор папоротников при различных условиях хранения

Вид	Всхожесть, %			Коэффициент Стьюдента ( $t$ )	
	Контроль (К)	Жидкий азот (ЖА)	Лабораторные условия (ЛУ)	К/ЖА	К/ЛУ
<i>Сем. Aspleniaceae</i>					
<i>Asplenium incisum</i>	85 ± 3	88 ± 1	87 ± 4	0.9	0.3
<i>A. ruta-muraria</i>	8 ± 2	95 ± 2	3 ± 0.03	24.7*	2.0
<i>Сем. Athyriaceae</i>					
<i>Athyrium monomachii</i>	94 ± 2	50 ± 4	63 ± 3	10.4*	7.7*
<i>A. sinense</i>	78 ± 4	68 ± 3	60 ± 2	1.8	4.0*
<i>Сем. Dennstaedtiaceae</i>					
<i>Coptidopteris wilfordii</i>	86 ± 5	83 ± 2	84 ± 5	0.6	0.4
<i>Сем. Dryopteridaceae</i>					
<i>Polystichum braunii</i>	69 ± 4	69 ± 5	45 ± 3	0.1	4.3*
<i>Dryopteris sichotensis</i>	73 ± 6	86 ± 2	74 ± 5	1.1	0.1
<i>D. crassirhizoma</i>	88 ± 3	93 ± 1	78 ± 4	1.4	2.0
<i>D. fragrans</i>	64 ± 8	78 ± 5	90 ± 1	1.4	3.1*
<i>D. expansa</i>	90 ± 3	89 ± 2	60 ± 1	0.3	10.1*
<i>Сем. Hypolepidaceae</i>					
<i>Pteridium japonicum</i>	79 ± 4	76 ± 2	35 ± 3	0.5	7.9*
<i>Сем. Sinopteridaceae</i>					
<i>Aleuritopteris argentea</i>	29 ± 7	94 ± 1	79 ± 8	8.8*	4.5*

\* Разница достоверна при  $t \geq 2.78$ ,  $\alpha = 0.05$ .

Полученные нами результаты показывают, что реакция на замораживание спор в жидком азоте видоспецифична. Представители одного семейства и рода (*Asplenium*, *Athyrium*) могут по-разному реагировать на замораживание спор в жидком азоте (см. таблицу).

При хранении спор в лабораторных условиях в течение 120 суток всхожесть на уровне контроля сохранилась у пяти видов папоротников (представители родов *Asplenium* и *Coptidipteris*, *Dryopteris sichotensis*, *D. crassirhizoma*). Достоверное снижение всхожести от 18 (*Athyrium sinense*) до 45 % (*Pteridium japonicum*) также наблюдалось у пяти видов. Повысилась всхожесть спор *Dryopteris fragrans* (на 26 %) и *Aleuritopteris argentea* (на 50 %). В последнем случае, вероятно, проявился эффект “дозревания” спор. Наличие его, возможно, связано с особенностями дальневосточного климата и поздним высыпанием спор некоторых папоротников. После высыпания споры в течение 5–6 месяцев “дозревают” и их максимальная способность к прорастанию отмечается весной с наступлением благоприятных ус-

ловий для роста и развития гаметофитов (Храпко, 1996).

Исследования показали, что у представителей сем. *Dryopteridaceae* после 120 суток хранения в лабораторных условиях всхожесть спор изменилась неоднородно. Даже в пределах одного рода *Dryopteris* отмечалось повышение, снижение всхожести или сохранение ее на уровне контроля.

В условиях лаборатории споры папоротников подвергаются воздействию факторов внешней среды. Споры гигроскопичны и их равновесная влажность колеблется в соответствии с колебаниями влажности окружающего воздуха, что в сочетании с понижением или повышением температуры воздуха вызывает интенсивное протекание процессов метаболизма, в конечном счете это, вероятно, приводит к снижению всхожести спор, а затем к полной потере их способности к прорастанию. Известно, что при сверхнизких температурах обмен веществ в биологических системах практически останавливается, кроме того, исключается отрицательное влияние окружающих факторов среды обитания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Споры исследованных видов папоротников по-разному реагируют на замораживание при температуре –196 °С. Всхожесть размороженного материала может сохраняться без изменений, повышаться или снижаться. Криоконсервация не вызывает полной гибели спор. Несмотря на некоторое снижение всхожести, в отдельных случаях более 50 %, споры этих видов сохраняют способность к прораста-

нию. Исследования показывают, что криоконсервация может рассматриваться как один из перспективных методов долговременного хранения генетического материала редких, охраняемых и хозяйственно ценных видов папоротников российского Дальнего Востока.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума ДВО РАН, проект № 11-III-B-06-051.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Арнаутова Е.М.** Гаметофиты папоротников флоры СССР: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1988. 16 с.
- Гуреева И.И.** Равноспоровые папоротники Южной Сибири: Систематика, происхождение, биоморфология, популяционная биология. Томск, 2001. 158 с.
- Красная книга** Амурской области: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов: Офиц. изд. Благовещенск: Благовещ. гос. пед. ун-т, 2009. 446 с.
- Красная книга** Еврейской автономной области: Растения и грибы. Новосибирск, 2006. 247 с.
- Красная книга** Камчатки. Т. 2: Растения, грибы, термофильные микроорганизмы. Петропавловск-Камчатский, 2007. 342 с.
- Красная книга** Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Владивосток, 2008а. 688 с.
- Красная книга** Российской Федерации (растения и грибы). М., 2008б. 855 с.
- Красная книга** Сахалинской области: Растения. Южно-Сахалинск, 2005. 348 с.
- Красная книга** Хабаровского края: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных: официальное издание. Хабаровск, 2008в. 632 с.
- Крещенок И.А.** Криоконсервация спор папоротников российского Дальнего Востока // Материалы I (IX) Международ. конф. молодых ботаников. СПб., 2006. С. 253.
- Крещенок И.А.** Возможности пищевого использования папоротников Амурской области // Территориальные исследования: цели, результаты и перспективы: Материалы регион. школы-семинара молодых ученых, аспирантов и студентов. Биробиджан, 2007. С. 145–147.
- Крещенок И.А.** Возможности лекарственного использования дальневосточных видов рода *Dryopteris* // Региональные проблемы. 2008. Вып. 10. С. 76–78.
- Крещенок И.А., Нестерова С.В.** Влияние криоконсервации на жизнеспособность спор азиатских видов *Polystichum* Roth // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы Восьмой междунар. науч.-практ. конф. Барнаул, 2009. С. 306–308.

- Мацкевич Н.В., Денбновецкий Г.Ю., Мамедова Э.Т., Семашко А.Ю., Лутков А.А., Кучерявая О.А., Новак О.Г., Озерская С.М., Налепина Л.Н., Кобякова Т.Е., Клицов С.В.** Научно-методические указания по криоконсервации макромицетов и папоротниковидных с использованием морфологического и цитологического тестирования. М., 1996. 29 с. Деп. в ВИНТИ, 1996. № 3684 – В96.
- Науялис И.И., Филин В.Р.** Щитовник мужской // Биол. флора Моск. обл. М., 1983. С. 3–25.
- Нестерова С.В., Крещенок И.А., Наврость Е.Н.** Криоконсервация спор дикорастущих и коллекционных папоротников // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки: Материалы конференции. 2008. Т. 9. С. 145–146.
- Храпко О.В.** Папоротники юга Дальнего Востока России (биология, экология, вопросы охраны генофонда). Владивосток, 1996. 200 с.
- Шмаков А.И.** Определитель папоротников России. Барнаул, 2009. 126 с.
- Agrawal D.C., Pawar S.S., Mascarenhas A.F.** Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. f.: An endangered tree fern // J. Plant. Physiol. 1993. V. 142. P. 124–126.
- Ballesteros D.** Conservation of Fern Spores // Working with Ferns: Issues and Applications (Eds. H. Fernández et al.). N.Y., 2011. P. 165–172.
- Ballesteros D., Ibars A.M., Estrelles E.** New data about pteridophytic spore conservation in germplasm banks // Plantaeuropa IV<sup>th</sup> Conference, Valencia, Espania, 2004. [Electronic resource]: [http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Ballesteros\\_daniel.pdf](http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Ballesteros_daniel.pdf) (дата обращения 29.08.2011).
- Ballesteros D., Walters C.** Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures // Cryobiology. 2007. V. 55. P. 1–9.
- Kreshchenok I., Nesterova S.** Genome conservation for rare and ornamental species of Russian Far East Ferns by Cryopreservation // III Global Botanic Gardens Congress, China, Wuhan, 2007 [Electronic resource]: <http://www.bgci.org/wuhan/posters> (дата обращения 29.08.2011).
- Pangua E., Garcia-Alvarez L., Pajarón S.** Studies on *Cryptogramma crispera* spore germination // Amer. Fern. J. 1999. V. 89. P. 159–170.
- Pence V.C.** Cryopreservation and in vitro methods for ex situ Conservation of *Pteridophytes* // Fern Gaz. 2002. V. 16, N 6–8. P. 362.
- Pence V.C.** Cryopreservation of Bryophytes and Ferns / in Plant Cryopreservation: A Practical Guide / B.M. Reed (Ed.). N.Y., 2008. P. 117–140.
- Quintanilla L.G., Amigo J., Pangua E., Pajarón S.** Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species // Ann. Bot. 2002. V. 90. P. 461–467.
- Rogge G.D., Viana A.M., Randi A.M.** Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: An endangered tree fern indigenous to south and central America // CryoLetters. 2000. V. 21. P. 223–230.
- Simabukuro E.A., Dyer A.F., Felipe G.M.** The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii* // Am. Fern. J. 1998. V. 88. P. 72–80.
- Wardlaw A.C.** Conservation of tree Ferns ex situ // Fern Gaz. 2002. V. 16, N 6–8. P. 393.