

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.10.101>

УДК 58.036:577/.112/.152.1/.19:582.542.11

**Л.М. Бабенко¹, К.О. Романенко¹, М.М. Щербатюк¹,
О.В. Вашека², П.О. Романенко², В.А. Негрецький¹, І.В. Косаківська¹**

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ

² ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

Морфогенез гаметофіта папороті флори України *Polystichum aculeatum* (L.) Roth в культурі *in vitro*

Представлено академіком НАН України К.М. Ситником

Досліджено морфологію й характер проростання спор та особливості розвитку гаметофіта дикорослої папороті Polystichum aculeatum (L.) Roth в культурі in vitro. Встановлено, що проростання спор залежало від тривалості їх зберігання. В культурі in vitro проростали 80–95 % свіжозібраних спор. Після 4–6 місяців зберігання в лабораторних умовах схожість спор P. aculeatum коливалася від 68 до 95 %, після 1,5 року – не перевищувала 20 %. Виокремлено та встановлено часові межі чотирьох етапів морфогенезу гаметофіта. Показано, що проростання спор і формування протонем у P. aculeatum відбувалося за Vittaria-типом, розвиток проталія – за Aspidium-типом.

Ключові слова: *Polystichum aculeatum*, гаметофіт, протонема, проталій, талом.

Папоротеподібні (*Polypodiophyta*) – найчисленніша група вищих судинних спорових рослин, яка нараховує більше 12 тисяч видів, є одним із головних компонентів рослинного покриву суходолу [1, 2]. Папороті поширені практично в усіх регіонах земної кулі й зустрічаються майже в усіх біоценозах, починаючи від пустель і закінчуючи болотами, озерами, солоними водоймами. Конкурентна боротьба за ресурси із квітковими рослинами виявилася для папоротей еволюційним фактором, що призвів до диверсифікації екологічних ніш, спеціалізації видів, спалаху біологічного різноманіття та підвищення адаптивного рівня багатьох таксонів. Пейдж (2002) виділив основні причини, що лімітують широке розселення папоротей порівняно з квітковими, та переваги, які дають можливість вигравати конкурентну боротьбу за певні типи місцезростань. До перших автор включає наявність у папоротей незалежної фази гаметофіта, необхідність води для здійснення статевого процесу, відсутність контролю розмноження, обмежений і повільний ріст спорофіта, неможливість існування в широкому діапазоні умов, слабкий контроль за транспірацією. Серед переваг наводить, зокрема, здатність до фотосинтезу за умов низької інтенсивності освітлення, ви-

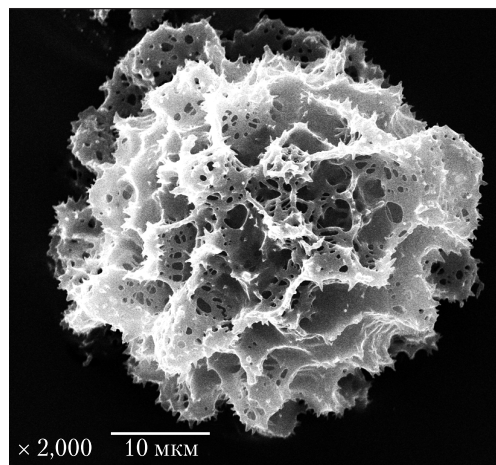


Рис. 1. Загальний вигляд спори *P. aculeatum* (SEM)

до умов існування [5]. Вільноживучі гаметофіти потенційно двостатеві, на їх пластинках можуть формуватись як антеридії, так і архегонії. Проте залежно від зовнішніх факторів (серед яких екзогенні фітогормони) гаметофіти можуть формуватись як одностатеві або змінювати стать [5]. Метою нашого дослідження було визначити характер проростання спор та морфологію й особливості розвитку гаметофіта *Polystichum aculeatum* (L.) Roth в культурі *in vitro*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були спори та гаметофіти рівноспорової папороті *Polystichum aculeatum* (L.) Roth (багаторядник шипуватий) з родини Dryopteridaceae. Це розетковий гемікриптофіт заввишки 80–100 см з вічнозеленим феноритмотипом. Зростає переважно в умовах підвищеної вологості. Кореневище товсте, коротке, на верхівці щільно вкрите бурими лусками. Ваї монормфні, з коротким черешком, вкритим численними бурими лусками. Листкова пластинка ланцетна, шкіряста та блискуча, двічі перисторозсічена. В Україні вид поширений в Карпатах, Гірському Криму, а також трапляється в лісостеповій зоні, де віддає перевагу свіжим та сирым ґрунтам, а також глинистим та вапняковим субстратам у лісах і на схилах ярів [6]. Спори збирали з рослин, що зростали на експозиційній ділянці вищих спорових рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна в Києві. Фенологічні спостереження за інтродуцентом проводили згідно з методичними рекомендаціями Ю.А. Котухова [7] з модифікаціями О.В. Вашеки [8], розробленими для папоротеподобних. Спори збирали в кінці липня. Фертильні ваї зрізали і зберігали в паперових паке-тах у сухих умовах до висипання спор. Спори відділяли від фрагментів ваї і спорангіїв шляхом струшування і зберігали при 20 °С.

Перед посівом спори промивали стерильною дистильованою водою, центрифугували протягом 15 хв при 9000 об/хв, витримували в 40 % етиловому спиртї 1,5 хв, тричі проми-вали стерильним дистиллятом, після чого проводили посів на стерильне рідке живильне середовище Кнопа в чашки Петрі. Спори пророщували при 22–25 °С, щільності фотонного потоку 35–40 мкмоль · м⁻² · с⁻¹, фотоперіод складав 16 : 8 (день : ніч), кислотність середо-вища рН 5,8–6,0. Спостереження проводили відповідно до стадій розвитку гаметофіта, настання стадій визначали за двома датами: від появи перших екземплярів до максимальної

соку стійкість до інтенсивного зволоження, толе-рантність до субстрату, бідного на мінеральні речо-вини, стійкість спор до пошкоджень у повітряному середовищі, пойкилогідричність гаметофітів деяких видів, потенційну довговічність спорофітів, міко-трофію, поліплоїдію [3]. Результатом адаптацій до умов існування стала поява різних життєвих форм папоротей, які різняться за будовою й фізіологіч-ними особливостями.

Характерною ознакою папоротей є чергування поколінь, яке забезпечує незалежний розвиток не-статевого (спорофіта) і статевого (гаметофіта) по-колінь [4]. Гаметофіт і спорофіт, як окремі індиві-ди, відрізняються за морфологією і фізіологічними властивостями та відзначаються різними вимогами



Рис. 2. Проростаюча спора *P. aculeatum* з ризоїдом (а), сформована однорядна протонема (б), лопаткодібний проталій (в)

Рис. 3. Формування серцеподібного талому *P. aculeatum*: а – рання фаза (50–60 діб); б – зрілий талом (100 діб з моменту посіву спор)

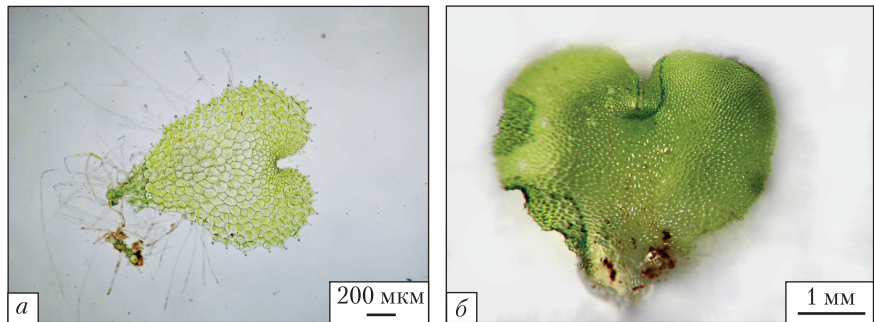
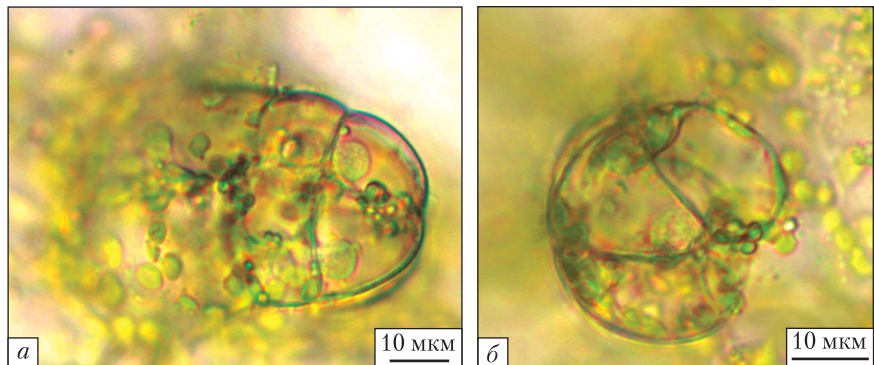


Рис. 4. Архегоній (а) та антеридій (б) гаметофіта *P. aculeatum*



кількості екземплярів. У спор кожного виду вимірювали (у мкм) екваторіальний діаметр (E) та полярну вісь (P). За їхнім співвідношенням визначали форму спор. Для опису морфології спор використовували термінологію В.П. Гричука та М.Х. Монозон [9], для опису морфології та онтогенезу гаметофітів – термінологію О.М. Арнаутової [10]. Зокрема, спору вважали пророслою з моменту розриву екзини і появи першого ризоїда або проталіальної клітини (однієї з двох клітин, що утворюються під час першого поділу спори). Проталіальною ниткою або протонемою називали ряд перших клітин гаметофіта, які утворювалися під час проростання спори, проталієм – наступну стадію розвитку гаметофіта після протонемі, від початку двовимірного росту – до утворення статевих органів (антеридіїв чи архегоніїв), таломом – тіло гаметофіта на завершальних етапах його розвитку: від формування гаметангіїв до утворення спорофіта чи відмирання. Зразки обстежували з інтервалом в один тиждень

день. Морфологію спор і гаметофітів аналізували за допомогою сканувального електронного мікроскопа (СЕМ) JEOL JSM-6060 LA (Японія), світлового мікроскопа Carl Zeiss Primo Star (Німеччина) з фотонасадкою та стереомікроскопа ЛОМО МБС-9 (СРСР). Кількість пророслих спор вираховували за відношенням до непророслих. Отримані дані виражали у відсотках. Усі досліди проводили в трьох біологічних і трьох аналітичних повторах. Отримані результати статистично обробляли в програмі Excel стандартного пакета Microsoft Office 2013. Достовірність різниці оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента, використовуючи 5 % рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати і їх обговорення. Спори *P. aculeatum* світло-жовті, бобоподібні, з добре вираженим периспорієм. Периспорій ареолятний: звивисто-складчастий з конічними здутими виростами чи мішечками, загостреними або заокругленими на верхівці. Поверхня складок периспорія ямчасто-горбиста, рідше — бородавчата. Поверхня периспорія перфорована (рис. 1). Екваторіальний діаметр спор разом із периспорієм становив $46,9 \pm 0,9$ мкм, довжина по полярній осі сягала $33,1 \pm 0,4$ мкм. З урахуванням морфологічних особливостей і характеру периспорія спори даного виду віднесено до чарунково-складчастого типу [9].

Відомо, що для проростання спор папоротей необхідне поєднання цілого ряду сприятливих факторів [11]. Оскільки в природних місцях зростання умови не завжди виявляються оптимальними, значна частина спор не проростає. Це компенсується великою кількістю спор, що продукуються однією особиною, і сприяє створенню банку спор [12], життєздатність яких зменшується впродовж зберігання [13]. Проростання свіжозібраних спор *P. aculeatum* становило 95–80 %. У разі посіву через 6 місяців після зберігання в лабораторних умовах проростало 68–85 % спор. Схожість спор через 1,5–2 роки зберігання не перевищувала 20 %.

При культивуванні на живильному середовищі Кнопа спори *P. aculeatum* починали проростати на 9–11-ту добу від моменту посіву (рис. 2, а).

Проростання спор і формування протонеми у *P. aculeatum* згідно з класичною класифікацією Найяра (1971) відбувалося за *Vittaria*-типом [14]: короткий ризоїд з'являвся першим і мав стінку, перпендикулярну полярній осі проталіальної клітини. Перша проталіальна клітина була щільно заповнена хлоропластами, тоді як у ризоїдах хлоропласти були відсутні (див. рис. 2, а). Згідно з альтернативною класифікацією розвитку гаметофітів Імачі (2013), що базується на розміщенні їх меристем, розвиток гаметофіта *P. aculeatum* відбувався за *Lygodium*-типом [15], однак ця класифікація нова і поки не є загальноприйнятою. Перша клітина ділилася перегородкою, утворюючи апікальну. Поперечний поділ апікальної клітини призводив до утворення однорядної нитки — протонеми — завдовжки 6–20 клітин (див. рис. 2, б). Клітини протонеми були короткі, циліндричні, співвідношення довжини до ширини становило від 1 : 1 до 3 : 1. Їх цитоплазма містила багато хлоропластів. На базальних клітинах проталіальної нитки спостерігали утворення до трьох прозорих ризоїдів (див. рис. 2, б). На 16–20-ту добу з моменту посіву спор відбувалась диференціація протонеми у лопаткоподібний проталій (див. рис. 2, в). Апікальна клітина нитки ділилася поздовжньо кілька разів і формувала злегка асиметричний лопаткоподібний проталій, на якому утворювалися ризоїди (див. рис. 2, в). Лопаткоподібний проталій нараховував від 4 до 20 клітин. Розвиток проталія відбувався за *Aspidium*-типом, що притаманний представникам родини Dryopteridaceae [14].

Меристема проталія утворювала виїмку, формуючи два крила, а вздовж країв пластинки формувалися одноклітинні сосочкоподібні залозисті трихоми (див. рис. 2, *в*). Ковпачки на верхівці трихом були наповнені дрібними хлоропластами. Більшість маргінальних клітин, що несли трихоми, мали видовжену форму і служили основою для волосків, через що край талому виглядав досить нерівним.

На 50–60 добу гаметофіт *P. aculeatum* набував характерну для папоротей даної родини форму серцеподібної пластинки із симетричними крилами (див. рис. 3, *а*). Через 70 діб після посіву спор спостерігали розвиток архегоніїв на центральній частині серцеподібного талому гаметофіта (див. рис. 4, *а*). Антеридії могли формуватися в різних місцях – у нижній частині талому, в області розміщення ризоїдів та на лопатях талому (див. рис. 4, *б*).

Таломи *P. aculeatum* на 100–120-ту добу з моменту посіву спор були округло-серцеподібної форми з двома добре розвинутими крилами (див. рис. 3, *б*) та рясними маргінальними одноклітинними залозистими волосками. На зрілому таломі були присутні численні, світло-коричневі ризоїди. Після 120 діб від посіву спор на зрілому таломі гаметофіта спостерігали розвиток спорофітів.

Отже, у результаті проведеного дослідження виокремлено етапи морфогенезу гаметофіта *P. aculeatum* у культурі *in vitro* і встановлено їх часові межі. Перший етап – проростання спори, утворення і розвиток протонеми (10–15 діб після посіву (д.п.п.); другий – розвиток лопаткоподібного проталія (15–50 д.п.п.), третій – утворення серцеподібного талому (50–60 д.п.п.); четвертий – розвиток спорофіта на поверхні талому гаметофіта (100–120 д.п.п.). Проростання спор і формування протонеми у *P. aculeatum* відбувалося за *Vittaria*-типом, розвиток проталію – за *Aspidium*-типом. Встановлено, що в культурі *in vitro* проростали 80–95 % свіжозібраних спор. Після 4–6 місяців зберігання в лабораторних умовах схожість коливалася від 68 до 95 %, після 1,5–2 років – не перевищувала 20 %.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бабенко Л.М., Шейко О.А., Косаківська І.В., Веденічова Н.П., Негрецький В.А., Вашека О.В. Структурно-функціональні особливості папоротепоподібних (Polypodiophyta). *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біол.* 2015. Вип. 1. С. 80–103.
2. Ross M. Mapping the world's pteridophyte diversity, systematics and floras. *Pteridology in Perspective*. Camus J.M, Johns R.J. (Eds.). Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. P. 29–42.
3. Page C. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2002. **119**. P. 1–33.
4. Haufler C.H., Pryer K.M., Schuettpelz E., Sessa E.B., Farrar D.R., Moran R., Schneller J.J., Watkins J.E., Jr, Windham M.D. Sex and the single gametophyte: revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience*. 2016. **66**, № 11. P. 928–937.
5. Atallah N.M, Banks J.A. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front. Plant Sci.* 2015. **6**. P. 100–107.
6. Вашека О.В., Безсмертна О.О. Атлас папоротей флори України. Київ: Паливода А.В., 2012. 160 с.
7. Котухов Ю.А. Методика фенонаблюдений за папоротниками семейства Polypodiaceae R. Вр. *Бюл. Глав. бот. сада.* 1974. Вип. 94. С.10–18.
8. Вашека О.В. Деякі біологічні особливості інтродукованих у відкритий ґрунт Ботанічного саду ім. акад. О.В.Фоміна папоротей роду *Dryopteris* Adans. *Бюл. Держ. Нікітського бот. саду.* 2004. **89**. С. 12–15.
9. Гричук В.П., Моносзон М.Х. Определитель однолучевых спор папоротников из семейства Polypodiaceae R. Вр., произрастающих на территории СССР. Москва: Наука, 1971. 126 с.

10. Арнаутова Е.М. Гаметофиты равноспоровых папоротников. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2008. 456 с.
11. Suo J., Chen S., Zhao Q., Shi L., Dai Sh. Fern spore germination in response to environmental factors. *Front. Biol.* 2015. **10**, № 4. P. 358–376.
12. Schneller J.J. Untersuchungen an einheimischen Farnen, insbesondere der *Dryopteris filix-mas*-gruppe. 3. Teil. Okologische Untersuchungen. *Ber. Schweiz. bot. Ges.* 1975. **85**, № 2. P. 110–159.
13. 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. **90**, № 4. P. 461–467.
14. Nayar B.K., Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.* 1971. **37**. P. 295–396.
15. Imaichi R. A new classification of the gametophyte development of homosporous ferns, focusing on meristem behavior. *Fern gaz.* 2013. **19**, № 5. P.141–156.

Надійшло до редакції 08.06.2017

REFERENCES

1. Babenko, L. M., Sheyko, O. A., Kosakivska, I. V., Vedenichova, N. P., Nehretskiy, V. A. & Vasheka, V. A. (2015). Structural and functional characteristics of Pteridophytes (Polypodiophyta). *Bull. Kharkiv Natl. Agr. Univ., Ser. Biol., Iss. 1*, pp. 80-103 (in Ukrainian).
2. Ross, M. (1996). Mapping the world's pteridophyte diversity, systematics and floras. In Camus, J.M., Johns, R.J. (Eds.) *Pteridology in Perspective* (pp. 29-42). Kew: Royal Botanic Gardens.
3. Page, C. (2002). Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Rev. Palaeobot. Paly-nol.*, 119, pp. 1-33.
4. Haufler, C. H., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Sessa, E. B., Farrar, D. R., Moran, R., Schneller, J. J., Watkins, J.E., Jr. & Windham, M. D. (2016). Sex and the single gametophyte: revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience*, 66, No. 11, pp. 928-937.
5. Atallah, N. M. & Banks, J. A. (2015). Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front. Plant Sci.*, 6, pp.100-107.
6. Vasheka, O. V. & Bezsmertna, O. O. (2012). Atlas of the ferns flora of Ukraine. Kyiv: Palyvoda (in Ukrainian).
7. Kotuhov, Yu. A. (1974). Metodika fenonablyudeniy za paporotnikami semeystva Polypodiaceae. *Byul. Glav. bot. sada*, 94, pp. 10-18 (in Russian).
8. Vasheka, O. V. (2004). Deyaki biolohichni osoblyvosti introdukovanykh u vidkrytyy grunt Botanichnoho sadu im. akad. O.V. Fomina paporotey rodu *Dryopteris* Adans. *Byul. Derzh. Nikits'koho bot. sadu*, 89, pp. 12-15 (in Ukrainian).
9. Grichuk, V. P. & Monoszon, M. H. (1971). *Opredelitel odnoluchevyih spor paporotnikov iz semeystva Polypodiaceae* R. Br., proizrastayuschih na territorii SSSR, Moscow: Nauka (in Russian).
10. Arnautova, E. M. (2008). *Gametofityi ravnosporovyih paporotnikov*. St. Peterburg: Izd-vo St.-Peterb. un-ta (in Russian).
11. Suo, J., Chen, S., Zhao, Q., Shi, L. & Dai, Sh. (2015). Fern spore germination in response to environmental factors. *Front. Biol.*, 10, No. 4, pp. 358-376.
12. Schneller, J. J. (1975). Untersuchungen an einheimischen Farnen, insbesondere der *Dryopteris filix-mas*-gruppe. 3. Teil. Okologische Untersuchungen. *Ber. Schweiz. bot. Ges.*, 85, No. 2, pp. 110-159.
13. Quintanilla, L. G., Amigo, J., Pangua, E. & Pajarón, S. (2002). Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Ann. Bot.*, 90, No. 4, pp. 461-467.
14. Nayar, B. K. & Kaur, S. (1971). Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.*, 37, pp. 295-396.
15. Imaichi, R. (2013). A new classification of the gametophyte development of homosporous ferns, focusing on meristem behavior. *Fern gaz*, 19, No. 5, pp. 141-156.

Received 08.06.2017

Л.М. Бабенко¹, Е.А. Романенко¹, Н.Н. Щербатюк¹,
Е.В. Вашека², П.А. Романенко², В.А. Негрецький², І.В. Косаковская¹

¹ Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України, Київ

² УНЦ “Інститут біології і медицини”

Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

МОРФОГЕНЕЗ ГАМЕТОФІТА ПАПОРОТНИКА ФЛОРИ УКРАЇНИ *POLYSTICHUM ACULEATUM* (L.) ROTH В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Исследована морфологія і характер проростання спор і особливості розвитку гаметофіта дикорастущего папоротника *Polystichum aculeatum* (L.) Roth в культурі *in vitro*. Установлено, що проростання спор зависело від продовжителюності їх зберігання. В культурі *in vitro* проростали 80–95 % свіжесобраних спор. Після 4–6 місяців зберігання в лабораторних умовах всхожість спор *P. aculeatum* коливалася від 68 до 95 %, після 1,5 рока — не перевищала 20 %. Виділені і установлені часові межі чотирьох етапів морфогенеза гаметофіта. Показано, що проростання спор і формування протонеми у *P. aculeatum* відбувалися по *Vittaria*-типу, розвиток проталлія — по *Aspidium*-типу.

Ключевые слова: *Polystichum aculeatum*, гаметофіт, протонема, проталлій, таллом.

L.M. Babenko¹, K.O. Romanenko¹, M.M. Shcherbatiuk¹,
O.V. Vasheka², P.O. Romanenko², V.A. Negretsky¹, I.V. Kosakivska¹

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

² Institute of Biology and Medicine,

Taras Shevchenko National University of Kiev

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

GAMETOPHYTE MORPHOGENESIS OF A FERN *POLYSTICHUM ACULEATUM* L. ROTH OF UKRAINE'S FLORA IN CULTURE *IN VITRO*

The spore morphology and the germination pattern, as well as peculiarities of the gametophyte development of a wild fern *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. in culture *in vitro* are studied. The spore germination is found to be dependent on the duration of their storage. 80–95 % of freshly-picked spores have germinated in culture *in vitro*. After the 4–6-month storage under lab conditions, the germinating ability ranged within 68–95 %; after 1.5 months, it did not exceed 20 %. The time limits of four stages in gametophyte morphogenesis are singled out and established. The spore germination and the protonema formation in *P. Aculeatum* are shown to occur according to the *Vittaria*-pattern, prothallium development — according to the *Aspidium*-pattern.

Keywords: *Polystichum aculeatum*, gametophyte, protonema, prothallus, thallus.