

УДК 582.35: 58.036.5

doi: 10.17223/19988591/26/4

**И.А. Крещенок<sup>1</sup>, С.В. Нестерова<sup>2</sup>, И.И. Гуреева<sup>3</sup>, А.А. Кузнецов<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Амурский филиал Ботанического сада-института ДВО РАН, г. Благовещенск, Россия

<sup>2</sup> Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> Томский государственный университет, г. Томск, Россия

## **Криоконсервация хлорофиллсодержащих спор папоротников Восточной Азии**

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-31477-мол\_а) в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Соглашение № 14.В37.21.2004 от 14 ноября 2012 г.).

*Изучена всхожесть хлорофиллсодержащих спор папоротников после хранения в лабораторных условиях и замораживания в жидком азоте. Жизнеспособность спор *Matteuccia struthiopteris* проверялась каждый месяц. Установлено, что всхожесть спустя месяц после хранения в лабораторном помещении снизилась с 95 до 16%, за 7 месяцев споры потеряли способность к прорастанию. Исследована устойчивость зеленых спор папоротников к замораживанию при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Обнаружены существенные различия в процентном соотношении всхожести спор до и после глубокого замораживания: у некоторых видов всхожесть снизилась почти вдвое, но полной потери способности к прорастанию не наблюдалось.*

**Ключевые слова:** споры; всхожесть; криоконсервация; *Matteuccia*; *Osmundastrum*; *Onoclea*.

### **Введение**

Данные о длительности периода, в течение которого споры папоротников умеренных широт сохраняют жизнеспособность, противоречивы. По некоторым данным, не содержащие хлорофилла споры сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет, известны случаи прорастания спор отдельных видов после 15–20 лет хранения в гербарии [1–5]. Но, по мнению большинства исследователей, споры папоротников относительно быстро теряют способность к прорастанию под воздействием внешней среды. При комнатной температуре бесхлорофилльные споры могут сохранять всхожесть от нескольких месяцев до 2–3 лет [2, 6, 8–10]. Не содержащие хлоропластов споры обладают периодом индуцированного покоя: число проросших спор увеличивается спустя 1–6 мес хранения на холоде [11]. Период хранения при пониженных температурах увеличивается, например, споры *Athyrium filix-femina* при температуре от 0 до  $+5^{\circ}\text{C}$  жизнеспособны 3 года [4].

Споры видов *Matteuccia*, *Onoclea*, *Osmundastrum*, содержащие хлоропласты, физиологически активны сразу после созревания, не имеют периода покоя и быстро теряют жизнеспособность при хранении [12, 13]. Возможными причинами потери жизнеспособности называют биохимические и метаболические факторы, нарушение процессов дыхания и целостности мембран, инактивацию ферментов и гормонов роста [14]; генетические факторы, например хромосомные мутации [15], утрату способности к фотосинтезу после высыхания [16]. В процессе хранения первыми подвергаются распаду зеленые пигменты, хлорофиллы *a* и *b* распадаются полностью [2, 17].

В сохранении растений *ex situ* большое значение имеют банки зародышевой плазмы. В настоящее время в генных банках преимущественно сосредоточены геномы семенных растений, для продления жизни которых применяется хранение при пониженных температурах. Исследования, проведенные за рубежом и в России, показали, что наиболее эффективна криоконсервация, или замораживание в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) [18–20 и др.]. Вопрос о долговременном хранении генетического материала сосудистых споровых растений менее изучен. Первый банк спор папоротников был создан в Королевском Ботаническом саду г. Эдинбург [15]. Исследования влияния криоконсервации на споры начались в девяностых годах XX в. [21, 22] и продолжились в начале нового века [10, 12, 13, 23–28]. Метод криоконсервации применялся сначала к спорам тропических видов папоротников [21], а позже – к спорам папоротников умеренной климатической зоны [22–24, 26]. Однако подобных работ немного, и число изученных видов невелико. В дальневосточном регионе исследования устойчивости зеленых, содержащих хлоропласты спор папоротников к замораживанию при температуре жидкого азота ранее не проводились.

На Дальнем Востоке России произрастают 5 видов папоротников, имеющих содержащие хлорофилл споры. Два из них (*Osmundastrum pilosum*, *Matteuccia orientalis*) – редкие виды и внесены в региональные красные книги и Красную книгу России. *Matteuccia struthiopteris* и *Osmundastrum asiaticum* являются пищевыми растениями и издавна известны в кулинарии азиатских народов. Заготовка их в некоторых районах российского Дальнего Востока в конце XX в. имела почти промышленные масштабы для экспорта в Корею и Китай. Эти виды обладают выраженными лекарственными свойствами и применяются в народной медицине. *Onoclea interrupta* и вышеперечисленные папоротники высокодекоративны и активно используются в озеленении.

Значительную опасность для популяций этих папоротников представляет активное изменение биоценозов человеком. Вырубка лесов, строительство дорог, нефтепровода, газопровода, затопление или осушение, разработка и преобразование территорий влекут за собой уменьшение числа популяций этих видов и численности особей в них.

Цель работы: изучить влияние глубокого замораживания на жизнеспособность хлорофиллсодержащих спор папоротников Восточной Азии и оце-

нить возможность применения криоконсервации как метода долговременного хранения спор.

### Материалы и методики исследования

Материалом для исследований послужили хлорофиллсодержащие споры папоротников, произрастающих на российском Дальнем Востоке.

*Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. – страусник обыкновенный. Голарктический вид, широко распространенный на территории Восточной Азии. Используется в пищу, применяется в народной медицине.

*Matteuccia orientalis* (Hook.) Trev. – страусник восточный. Восточноазиатский вид, в России находится на северо-восточной границе ареала. Известно до 5 местонахождений в Сахалинской области и Приморском крае. Редкий вид, внесен в красные книги Сахалинской области и Приморского края, категория – «уязвимый» [29, 30].

*Osmundastrum asiaticum* (Fern.) Tagawa – чистоустник азиатский. Восточноазиатский вид, произрастающий в Приморском и Хабаровском краях, Еврейской автономной и Сахалинской областях и в южных районах Амурской области. Используется в пищу, является объектом заготовок в промышленном масштабе для экспорта.

*Osmundastrum pilosum* (Wall. ex Grev. et Hook.) Schmakov (= *O. claitonianum* (L.) Tagawa) – чистоустник волосистый. Восточноазиатский вид, в России произрастает на северной границе ареала. Встречается на юге Приморского и в Хабаровском краях. Редкий вид, внесен в Красную книгу России и региональные красные книги, категория – «уязвимый» [29–31].

*Onoclea interrupta* (Maxim.) Ching et P.C. Chiu (= *O. sensibilis* auct. non L.) – оноклея прерывистая. Широко распространенный восточноазиатский вид.

Споры папоротников собирали в июне (виды *Osmundastrum*) и осенью (представители родов *Matteuccia* и *Onoclea*) в естественных популяциях на территории Амурской области и в коллекциях Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Владивосток), Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (г. Новосибирск). Вайи или доли второго порядка (у видов с большим размером вай) помещали в бумажные пакеты и располагали в затененном хорошо проветриваемом месте до высыпания спор из спорангиев. Одну часть свежесобранных спор оставляли в бумажных пакетах и хранили в лаборатории. Один раз в месяц проверяли их всхожесть. Другую часть материала закрывали в криопробирки и погружали в жидкий азот (–196°C). Время экспозиции 14 дней. Размораживание проводили на воздухе в лаборатории при температуре +20...+22°C. Контрольные образцы не подвергали замораживанию. Споры проращивали в чашках Петри диаметром 12 см с дистиллированной водой. В каждой чашке с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 в пяти полях зрения подсчитывали и затем суммировали проросшие и непроросшие споры. Для каждого исследуемого вида папо-

ротника значимость различий проросших и непроросших спор в контроле и эксперименте проверяли по критерию  $\chi^2$  с использованием четырехпольной таблицы вариант [32. С. 29]. На уровне значимости  $W = 0,05$  различие считали существенным, если вычисленное значение критерия  $\chi^2$  превышало табличное значение. Жизнеспособность спор оценивали по всхожести. Всхожесть выражали в процентах как отношение числа проросших спор к сумме проросших и непроросших.

### Результаты исследования и обсуждение

Свежесобранные споры *M. struthiopteris* имели высокую всхожесть – 95%. В результате регулярного тестирования выявлена динамика снижения всхожести при хранении в лабораторном помещении (рис. 1). За месяц всхожесть снижалась почти на 80%. Через два месяца после сбора прорастали менее 10% спор. Всхожесть спор, хранившихся четыре месяца, составляла около 1%, через семь месяцев хранения споры теряли жизнеспособность, всхожими оставались менее 1%.

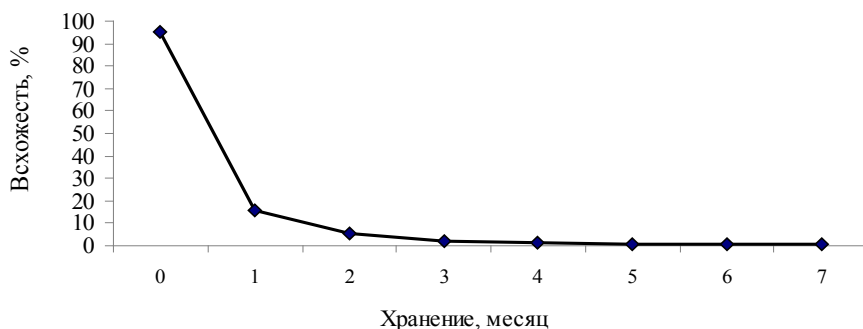


Рис. 1. Снижение всхожести спор *Matteuccia struthiopteris* при хранении в лабораторном помещении

Fig. 1. Decrease in *Matteuccia struthiopteris* spores germination during storage in a laboratory (on the ordinate axis – Germination ability (%), on the abscissa axis – Storage (months))

Хлорофиллсодержащие споры сохраняют способность к прорастанию от нескольких дней до нескольких месяцев [10, 12, 13, 33]. Этот показатель зависит как от внешних факторов среды, так и от биологических особенностей вида. Например, споры *Hymenophyllaceae* и *Grammitidaceae* жизнеспособны до двух недель и начинают прорастать, еще находясь в спорангии [10]. Споры *Osmunda regalis* L. более жизнеспособны – всхожесть сохраняется около месяца. По данным R.M. Lloyd и E.J. Klekowski Jr. (1970) [34], жизнеспособность спор некоторых видов *Onoclea* и *Matteuccia* сохраняется на протяжении 1 года.

Споры *M. struthiopteris* потеряли способность к прорастанию за семь месяцев хранения, что характеризует их биологическую недолговечность. Всхожесть резко снижается в течение первого месяца (на 80%, см. рис. 1), поэтому для практических целей необходимо использовать свежесобранные споры. Наши результаты дополняют ранее полученные данные о кратковременном хранении зеленых спор папоротников при комнатной температуре; разработка методов длительного хранения спор такого типа в настоящее время достаточно актуальна.

Споры изучаемых видов папоротников подвергли замораживанию в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Результаты эксперимента представлены в таблице.

**Всхожесть хлорофиллсодержащих спор папоротников /  
Germination of chlorophyll-containing fern spores**

Вид / Species	Споры, число / Spores, number				Критерий, $\chi^2$ */ Criterion, $\chi^2$ *	Всхожесть, % / Germination ability, %	
	Проросшие / Germinated		Непроросшие / Undergerminated			1	2
	1	2	1	2			
<i>Matteuccia struthiopteris</i>	517	447	25	148	88,7	95	75
<i>M. orientalis</i>	242	210	198	286	15,5	55	42
<i>Osmundastrum asiaticum</i>	449	211	43	213	192,7	91	50
<i>O. pilosum</i>	305	129	22	176	186,4	93	42
<i>Onoclea interrupta</i>	331	221	81	170	51,8	80	56

Примечание. 1 – контроль, 2 – эксперимент ( $-196^{\circ}\text{C}$ ); \* если  $\chi^2$  вычисленное  $\geq 3,841$ , различия статистически значимы /

Note. 1 – control, 2 – experiment ( $-196^{\circ}\text{C}$ ); \* if  $\chi^2 \geq 3.841$ , statistically significant difference.

До замораживания (контроль) споры четырех изученных видов имели всхожесть от 80 до 95% и только споры одного вида (*Matteuccia orientalis*) отличались более низкой всхожестью – менее 60%. Споры всех изученных видов реагировали на глубокое замораживание. Анализ полученных данных показал, что после криоконсервации всхожесть статистически значимо снизилась. Наиболее значительное снижение наблюдалось у видов рода *Osmundastrum* – почти в 2 раза по сравнению с контрольным значением. Однако в целом через 14 дней хранения в жидком азоте осталось от 42% (*Matteuccia orientalis*, *Osmundastrum pilosum*) до 75% (*Matteuccia struthiopteris*) спор, способных к прорастанию (таблица).

В лабораторных условиях через месяц хранения всхожесть спор *Matteuccia struthiopteris* снизилась на 80%, а после криоконсервации – на 20%. Этот факт говорит о том, что применение метода криоконсервации для хранения хлорофиллсодержащих спор дальневосточных папоротников можно считать перспективным.

В криобанках хранение генетического материала не ограничено по времени, поэтому полученные результаты согласуются с данными зарубежных

исследователей [13]. Кроме того, S. Magrini и A. Scoppola [35] отмечают, что низкие температуры стимулируют быстрое прорастание спор и развитие гаметофитов (если сравнивать со спорами, хранившимися при пониженных температурах – от +5°C до –5°C). Интенсивность развития гаметофитов и прорастания спор, хранившихся при отрицательных температурах, близки к показателям свежесобранных спор.

В эксперименте всхожесть зеленых спор дальневосточных папоротников снизилась на 13–50% в зависимости от вида (таблица). У бесхлорофилльных спор после размораживания всхожесть чаще всего остается на уровне контроля или возрастает, в редких случаях наблюдалось незначительное снижение [26–28]. Большая потеря жизнеспособности зелеными спорами объясняется, возможно, их более высокой влажностью. Например, споры представителей рода *Osmunda* содержат около 17% влаги [10], в то время как у бесхлорофилльных спор папоротников влажность составляет от 4% [33]. Кроме того, в зеленых спорах содержится меньше гранул липидов, чем в бесхлорофилльных спорах [10], что, возможно, приводит к повреждению при замораживании.

Зарубежные исследования показали, что зеленые споры переносят глубокое замораживание, если сразу после сбора их подсушивают на воздухе или в силикагеле [12, 13, 21], а затем помещают в жидкий азот. Однако высушивание не должно быть полным, так как сильное обезвоживание приводит к невозможности фотосинтеза и потере жизнеспособности [16]. Эксперименты S. Magrini и A. Scoppola [35] показали, что всхожесть спор, не подвергавшихся предварительной сушке, значительно выше, чем предварительно высушенных. Относительная влажность воздуха в разных частях света различна, на побережье она значительно выше, чем внутри континента [10]. Излишняя влажность воздуха отрицательно сказывается на хранении спор папоротников. Вероятно, поэтому данные D. Ballesteros [Там же] о терпимости зеленых спор к высушиванию противоречат данным S. Magrini с A. Scoppola [35]. Мы полагаем, что при высокой влажности воздуха зеленые споры необходимо подсушивать перед криоконсервацией. В наших экспериментах замораживанию подвергались споры с равновесной влажностью, которые предварительно подсушивались на открытом воздухе в лаборатории.

### Выводы

Хлорофиллсодержащие споры *Matteuccia struthiopteris* полностью теряют жизнеспособность при хранении в лабораторных условиях в течение 7 месяцев.

Экспериментально выявлена устойчивость хлорофиллсодержащих спор 5 видов дальневосточных папоротников к глубокому замораживанию. Несмотря на то, что всхожесть спор *Matteuccia*, *Osmundastrum*, *Onoclea* статистически значимо снижается, криоконсервация не вызывает полной потери способности к прорастанию. В зависимости от вида после размораживания

сохраняется от 42% (*Matteuccia orientalis*, *Osmundastrum pilosum*) до 75% (*Matteuccia struthiopteris*) жизнеспособных спор.

Криоконсервация может рассматриваться как перспективный метод длительного хранения зеленых спор папоротников Восточной Азии.

### Литература

1. Котухов Ю.А. Выращивание папоротников из спор // Бюллетень Главного ботанического сада. 1968. № 71. С. 85.
2. Арнаутова Е.М. Гаметофиты равноспоровых папоротников. СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2008. 456 с.
3. Арнаутова Е.М. Развитие и строение гаметофитов *Coniogramme intermedia*, *Anogramma leptophylla* (Pteridaceae) // Ботанический журнал. 1998. Т. 83, № 12. С. 72–76.
4. Schneller J.J. Biosystematic investigations on the Lady fern (*Athyrium filix-femina*) // Plant Syst. Evol. 1979. Vol. 132, № 4. P. 255–275. doi 10.1007/BF00982389.
5. Windham M.D., Wolf P.G., Ranker T.A. Factors affecting prolonged stored spore viability in herbarium collections of three species of *Pellaea* // Amer. Fern J. 1986. Vol. 76, № 3. P. 141–148.
6. Патарая Л.М. К систематике половой генерации папоротников Аджарии // Ученые записки МОПИ им. Н.К. Крупской. 1968. Т. 181, вып. 12. С. 244–262.
7. Стеценко Н.М. Жизнеспособность спор некоторых видов папоротников // Бюллетень Главного ботанического сада. 1985. Вып. 138. С. 63–35.
8. Стеценко Н.М. Жизнеспособность спор папоротников-интродуцентов в зависимости от сроков хранения // Охрана, изучение и обогащение растительного мира. Киев, 1987. № 14. С. 18–21.
9. Науялис И.И. Факторы возникновения гаметофитов папоротников в природе // Ботанический журнал. 1989. Т. 74, № 6. С. 844–852.
10. Ballesteros D. Conservation of fern spores // Working with Ferns: Issues and Applications / eds. H. Fernández et al. N.Y. : Springer Science, 2011. P. 165–172.
11. Hamilton R.G. The significance of spore banks in natural populations of *Athyrium picnocarpon* and *A. thelypteroides* // Amer. Fern J. 1988. Vol. 78, № 3. P. 96–104.
12. Pence V.C. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen // Amer. Fern J. 2000. Vol. 90, № 4. P. 119–126.
13. Pence V.S. Cryopreservation of Bryophytes and Ferns // Plant Cryopreservation: A Practical Guide / ed. B.M. Reed. N.Y. : Springer Science, 2008. P. 117–141.
14. Beri A., Bir S.S. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. // Amer. Fern J. 1993. Vol. 83, № 3. P. 73–78.
15. Page C.N., Dyer A.F., Lindsay S., Mann D.G. Conservation of Pteridophytes – the *ex situ* approach // Fern horticulture: past, present and future perspectives / eds. J.M. Ide, A.C. Jermy, A.M. Paul. Andover : Intercept., 1992. P. 269–278.
16. Lebkuecher J.G. Desiccation-time limits of photosynthetic recovery in *Equisetum hyemale* (Equisetaceae) spores // Amer. Fern J. 1997. Vol. 84, № 6. P. 792–797.
17. Стеценко Н.М., Шевченко С.И. Биохимические аспекты потери жизнеспособности спор папоротников сем. Onocleaceae // Бюллетень Главного ботанического сада. 1988. № 151. С. 58–61.
18. Федосенко В.А. Использование сверхнизких температур для длительного хранения семян (методы и техника) // Науч.-техн. бюллетень / ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. 1978. Вып. 77. С. 53–57.
19. Stanwood P.C., Bass L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen // Seed Sci. and Technology. 1981. Vol. 9, № 2. P. 423–437.



20. Tikhonova V.L., Yashina S.G. Long-term storage of endangered wild plant seeds // *Physiol. Gen. Biol. Rev.* 1997. Vol. 13, pt 1. P. 1–33.
21. 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. Vol. 142. P. 124–126.
22. Мацкевич Н.В. и др. Научно-методические указания по криоконсервации макромицетов и папоротниковидных с использованием морфологического и цитологического тестирования. М., 1996. 29 с. Деп. ВИНТИ. № 3684 – В 96.
23. Pence V.C. Cryopreservation and in vitro methods for ex situ Conservation of Pteridophytes // *Fern Gaz.* 2002. Vol. 16, № 6–8. P. 362–368.
24. Ballesteros D., Ibars A.M., Estrelles E. New data about pteridophytic spore conservation in germplasm banks // *Plantaeuropa IV-th Conference*, Valencia, Espania, 2004. URL: [http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Procedings/Ballesteros\\_daniel.pdf](http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Procedings/Ballesteros_daniel.pdf) (дата обращения: 29.08.2011).
25. Ballesteros D., Estrelles E., Ibars A.M. Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in Germplasm Banks // *Fern Gaz.* 2006. Vol. 17. P. 293–302.
26. 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. URL: <http://www.bgci.org/wuhan/posters> (дата обращения: 29.08.2011).
27. Нестерова С.В., Крещенко И.А., Наврося Е.Н. Криоконсервация спор дикорастущих и коллекционных папоротников // *Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки.* 2008. Т. 9. С. 145–146.
28. Крещенко И.А., Нестерова С.В. Криоконсервация спор редких и хозяйственно ценных папоротников российского Дальнего Востока // *Растительный мир Азиатской России.* 2012. № 1. С. 22–25.
29. Красная книга Сахалинской области. Растения / отв. ред. В.М. Еремин. Сахалинское книжное издательство, 2005. 348 с.
30. Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Владивосток : Апельсин, 2008. 688 с.
31. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М. : Товарищество научных изданий КМК, 2008. 855 с.
32. Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных. М. : Наука, 1991. 184 с.
33. Гуреева И.И. Равноспоровые папоротники южной Сибири. Систематика, происхождение, биоморфология, популяционная биология. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2001. 158 с.
34. Lloyd R.M., Klekowski E.J.Jr. Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores // *Biotropica.* 1970. Vol. 2. P. 129–137.
35. Magrini S., Scoppola A. First results from conservation studies of chlorophyllous spores of the Royal fern (*Osmunda regalis*, Osmundaceae) // *Cryobiology.* 2012. Vol. 64. P. 65–69. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.10.001.

Поступила в редакцию 25.02.2013 г.; повторно 20.11.2013 г.;  
принята 19.04.2014 г.

#### Авторский коллектив:

**Крещенко Ирина Анатольевна** – канд. биол. наук, н.с. лаб. интродукции Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Благовещенск, Россия).

E-mail: [ikreshchenok@yandex.ru](mailto:ikreshchenok@yandex.ru)

**Нестерова Светлана Владимировна** – канд. биол. наук, доцент, вед.н.с. лаб. флоры Дальнего Востока Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Владивосток, Россия).

E-mail: [svnesterova@rambler.ru](mailto:svnesterova@rambler.ru)



**Гуреева Ирина Ивановна** – д-р биол. наук, профессор, заведующая Гербарием им. П.Н. Крылова Томского государственного университета (г. Томск, Россия).

E-mail: gureyeva@yandex.ru

**Кузнецов Александр Александрович** – н.с. Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: ys.tsu@mail.ru

*Tomsk State University Journal of Biology. 2014. № 2 (26). P. 42–52*

doi: 10.17223/19988591/26/4

**Irina A. Kreshchenok<sup>1</sup>, \*Svetlana V. Nesterova<sup>2</sup>,  
Irina I. Gureyeva<sup>3</sup>, Aleksandr A. Kuznetsov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Introduction, Amur Branch of Botanical Garden-Institute, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Blagoveshchensk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Laboratory of Flora of Far East, Botanical Garden-Institute, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation.*

\*E-mail: svnesterova@rambler.ru

<sup>3</sup> *P.N. Krylov Herbarium, Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

### **Cryopreservation of chlorophyllous spores of East Asian ferns**

The results of study of germination ability of spores of five fern species from the Russian Far East – *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., *M. orientalis* (Hook.) Trev., *Osmundastrum asiaticum* (Fern.) Tagawa, *O. pilosum* (Wall. ex Grev. et Hook.) Schmakov, *Onoclea interrupta* (Maxim.) Ching et P.C. Chiu. – after storage in the laboratory and freezing in liquid nitrogen are reported. Spores of the species studied contain chloroplasts, they have not a rest period and lose viability rapidly during storage. Most of these species are rare therefore there is a problem of the working out of methods for long-term storage of their green spores due to the rapid loss of germination ability by them. Spores were collected after maturation. One part of collected spores was put into the paper bags and kept in laboratory. Another part of the spores was placed in cryovials and immersed in liquid nitrogen (-196°C) for 14 days. Defrosting was conducted in the laboratory at the temperature +20 ... +22°C, then the spores germinated in Petri dishes wetting with distilled water. Spore viability was evaluated on their germination ability, which was calculated as the ratio of the number of germinated spores to the total number of sowed ones, expressed as a percentage. Dynamics of diminution of spore germination ability during storage in the lab was traced on the example of *Matteuccia struthiopteris*. Maximum of germinated spores (95%) is observed in the first days after collecting. Germination ability decreases approximately to 80% in a month. Less than 10% of spores germinated after 2 months of storage, and less than 1% of spores germinated after 7 months. The germination ability of spores of all the species studied decreased after deep freezing in liquid nitrogen, but from 42 to 75% of the spores remained viable. Thus chlorophyllous spores of the ferns studied are resistant to liquid nitrogen freezing therefore the cryopreservation is a perspective method for long-term storage of green spores of East Asian ferns.

*The article contains 1 table, 1 figure, 35 ref.*

**Key words:** spores; germination ability; kryopreservation; *Matteuccia*; *Osmundastrum*; *Onoclea*.

### **References**

1. Kotukhov UA. Vyrashchivanie paprotnikov iz spor [Growing of ferns from spores]. *Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada – Bulletin of the Main Botanical Garden*. 1968;71:85. In Russian

2. Arnautova EM. Gametofity ravnosporovykh paprotnikov [Gametophytes of the homosporous ferns]. St. Petersburg: SPb State University Publishers; 2008. 456 p. In Russian
3. Arnautova EM. Razvitiye i stroeniye gametofitov [Development and structure of Gametophytes of *Coniogramme intermedia*, *Anogramma leptophylla* (Pteridaceae)]. *Botanicheskiy zhurnal – Botanical journal*. 1998;83(12):72-76. In Russian
4. Schneller JJ. Biosystematic investigations on the Lady fern (*Athyrium filix-femina*). *Plant Syst. Evol.* 1979;132(4):255-275. doi 10.1007/BF00982389
5. Windham MD, Wolf PG, Ranker TA Factors affecting prolonged stored spore viability in herbarium collections of three species of Pellaea. *Amer. Fern J.* 1986;76(3):141-148.
6. Pataraja LM. K sistematike polovoy generatsii paprotnikov Adzharii [On systematics of sexual generation of ferns of Adzharia]. *Uchenye zapiski MOPI im. N.K. Krupskoy – Scientific notes of N.K. Krupskaya MOPI*. 1968;181(12):244-262. In Russian
7. Stezenko NM. Zhiznesposobnost' spor nekotorykh vidov paprotnikov [Spore viability of some species of ferns]. *Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada – Bulletin of the Main Botanical Garden*. 1985;138:63-35. In Russian
8. Stezenko NM. Zhiznesposobnost' spor paprotnikov-introduktentov v zavisimosti ot strokov khraneniya [Spore viability of fern-introduced species depending on periods of storage]. *Okhrana, izucheniye i obogashcheniye rastitel'nogo mira* [In: *Protection, studying and flora enrichment*]. Kiev: 1987;14:18-21. In Russian
9. Naujalis II. Faktory vozniknoveniya gametofitov paprotnikov v prirode [Factors of Fern gametophytes emergence in the nature]. *Botanicheskiy zhurnal – Botanical journal*. 1989;74(6):844-852. In Russian
10. Ballesteros D. Conservation of fern spores. In *Working with Ferns: Issues and Applications*. Fernández H, editor. New York: Springer Science; 2011. p. 165-172. doi 10.1007/978-1-4419-7162-3\_12
11. Hamilton RG. The significance of spore banks in natural populations of *Athyrium pycnocarpon* and *A. thelypteroides*. *Amer. Fern J.* 1988;78:96-104.
12. Pence VC. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. *Amer. Fern J.* 2000;90(4):119-126.
13. Pence VC. Cryopreservation of Bryophytes and Ferns. In: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Reed BM, editor. New York: Springer Science; 2008. p. 117-141.
14. Beri A, Bir SS. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. *Amer. Fern J.* 1993;83(3):73-78.
15. Page CN, Dyer AF, Lindsay S, Mann DG. Conservation of Pteridophytes – the *ex situ* approach. In: *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Ide JM, Jermy AC, Paul AM, editors. Andover: Intercept; 1992. p. 269-278.
16. Lebkuecher JG. Desiccation-time limits of photosynthetic recovery in *Equisetum hyemale* (Equisetaceae) spores. *Amer. Fern J.* 1997;84(6):792-797.
17. Stecenko NM, Schevchenko SI. Biokhimicheskie aspekty poteri zhiznesposobnosti spor paprotnikov sem. Onocleaceae [Biochemical aspects of viability loss of Onocleaceae spores]. *Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada – Bulletin of the Main Botanical Garden*. 1988;151:58-61. In Russian
18. Fedoseenko VA. Ispol'zovanie sverkhnizkikh temperatur dlya dlitel'nogo khraneniya semyan (metody i tekhnika) [Use of ultralow temperatures for long storage of seeds (methods and technique)]. *Nauch.-tekhn. byulleten' VNII rastenievodstva im. N.I. Vavilova – Scientific and technical bulletin. N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Growing*. 1978;77:53-57. In Russian
19. Stanwood PC, Bass LN. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. and Technology*. 1981;9(2):423-437.
20. Tikhonova VL, Yashina SG. Long-term storage of endangered wild plant seeds. *Physiol. Gen. Biol. Rev.* 1997;13(1):1-33.

21. Agrawal DC, Pawar SS, Mascarenhas AF. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. f.: An endangered tree fern. *J. Plant. Physiol.* 1993;142:124-126.
22. Mazkevich NV et al. Nauchno-metodicheskie ukazaniya po kriokonservatsii makromitsetov i paporotnikovidnykh s ispol'zovaniem morfologicheskogo i tsitologicheskogo testirovaniya [Scientific guidelines for cryopreservation of macromycetes and pteroids using morphological and cytologic testing]. Moscow: 1996. 29 p. [Department of All-Russian Institute for Scientific and Technical Information]. № 3684–B 96. In Russian
23. Pence VC. Cryopreservation and *in vitro* methods for *ex situ* Conservation of Pteridophytes. *Fern Gaz.* 2002;16(6-8):362-368.
24. Ballesteros D, Ibars AM, Estrelles E. New data about pteridophytic spore conservation in germplasm banks. In: *Plantaeuropa IV-th Conference*, Valencia, Espania, 2004. [Electronic resource]. Available at: [http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Ballesteros\\_daniel.pdf](http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Ballesteros_daniel.pdf) (29.08.2011).
25. Ballesteros D, Estrelles E, Ibars AM. Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in Germplasm Banks. *Fern Gaz.* 2006;17:293-302.
26. Kreshchenok I, Nesterova S. Genome conservation for rare and ornamental species of Russian Far East ferns by cryopreservation. In: *III Global Botanic Gardens Congress*, China, Wuhan, 2007 [Electronic resource]. Available at: <http://www.bgci.org/wuhan/posters> (29.08.2011).
27. Nesterova S, Kreshchenok I, Navros E. Cryopreservation of spores of wild-growing and collection ferns. *Kriokonservatsiya kak sposob sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya. Biofizika zhivoy kletki* [In: *Cryopreservation as a way of preserving biological diversity. Biophysics of living cell*]. 2008;9:145-146. In Russian
28. Kreshchenok I, Nesterova S. Cryopreservation of spores of rare and economically valuable ferns of the Russian Far East. *Rastitel'nyy mir Aziatskoy Rossii – Plant Life of Asian Russia*. 2012;1:22-25. In Russian
29. Krasnaya kniga Sakhalinskoy oblasti. Rasteniya [Red Book of Sakhalin oblast. Plants]. Eremin VM, editor. Yuzhno-Sakhalinsk: Sakhalin Publishing House; 2005. 348 p. In Russian
30. Krasnaya kniga Primorskogo kraja: Rasteniya. Redkie i nakhodyashchiesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy rasteniy i gribov [Red Book of Primorsky Krai: Plants]. Vladivostok: ABK “Apelsin”; 2008. 688 p. In Russian
31. Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby) [Red Book of the Russian Federation (Plants and Mushrooms)]. Moscow: Association of scientific editions KMK; 2008. 855 p. In Russian
32. Zaicev GN. Matematicheskiy analiz biologicheskikh dannykh [Mathematical analysis of biological data]. Moscow: Nauka; 1991. 184 p. In Russian
33. Gureyeva II. Ravnosporovye paprotniki Yuzhnoy Sibiri. Sistematika, proiskhozhdenie, biomorfologiya, populyatsionnaya biologiya [Homosporous ferns of South Siberia. Taxonomy, origin, biomorphology and population biology]. Tomsk: Tomsk University Publishers; 2001. 158 p. In Russian
34. Lloyd RM, Klekowski EJJr. Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica*. 1970;2:129-137.
35. Magrini S, Scoppola A. First results from conservation studies of chlorophyllous spores of the Royal fern (*Osmunda regalis*, Osmundaceae). *Cryobiology*. 2012;64:65-69. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.10.001

Received 25 February 2013;

Revised 20 November 2013;

Accepted 19 April 2014