

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ЦИТОКІНІНІВ НА ПРОРОСТАННЯ СПОР І МОРФОГЕНЕЗ ГАМЕТОФІТА *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.) SCHOTT В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

К.О. РОМАНЕНКО^{1,1}, І.В. КОСАКІВСЬКА^{1,2}, Л.М. БАБЕНКО^{1,3}, О.В. ВАШЕКА^{2,4},
П.О. РОМАНЕНКО^{2,5}, В.А. НЕГРЕЦЬКИЙ^{1,6}, В.М. МІНАРЧЕНКО^{3,7}

¹ Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

² Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
просп. Глушкова, 2, Київ, 01601, Україна

³ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця бульвар Т. Шевченка, 13. Київ, 01601, Україна

E-mail: katernaromanenko4@gmail.com¹, irynakosakivska@gmail.com², lilia.babenko@gmail.com³, olena.vasheka@gmail.com⁴,
petrorom@ukr.net⁵, negretsky@ukr.net⁶, valminar@ukr.net⁷

Уперше досліджено вплив екзогенних фітогормонів цитокінінової природи: кінетину, зеатину, 6-бензиламінопурину, №-2-ізопентеніладеніну на характер проростання спор та морфологію і особливості росту гаметофіта *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott в культурі *in vitro*. Встановлено, що в концентрації 10^{-5} М усі дослідженні цитокініни суттєво гальмували проростання спор, затримували ріст гаметофіта, викликали деформацію і зменшення розмірів талому, пригнічували розвиток статевих структур та ріст спорофіта. Зменшення концентрації гормонів до 10^{-8} М стимулювало розвиток гаметофіта, індукувало поділ клітин, особливо в апікальній зоні, через що частина таломів набувала деформованої форми, активувало утворення ризоїдів, впливало на формування антеридіїв та архегоніїв і затримувало розвиток спорофіта.

Ключові слова: *Dryopteris filix-mas*, гаметофіт, спори, проталій, талом, цитокініни, кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин, №-2-ізопентеніладенін

Вступ. Характерною ознакою папоротей є чергування у життєвому циклі двох поколінь, що передбачає незалежний розвиток спорофіта та гаметофіта. Процеси росту й розвитку гаметофіта та спорофіта у папоротей, як і у представників інших таксонів, контролюються багатокomпонентною гормональною системою [1]. Фітогормони – низькомолекулярні органічні сполуки координують генетично визначений ріст і розвиток рослин, а також безперервну інтеграцію екологічних сигналів [2, 3]. Як правило, вони діють у низьких концентраціях, а місце дії цих сполук часто відокремлено від

місця їхнього біосинтезу [4, 5]. Транспортування на короткі та великі відстані в рослині створює необхідні морфогенетичні градієнти для кожного гормону в окремих тканинах та органах [6].

Спора є першою клітиною статевого покоління – гаметофіта. Спори папоротей можуть перебувати в стані вимушеного спокою від декількох тижнів до року й навіть десяти років, зберігаючи при цьому схожість. Відомо, що на проростання спор більше ніж 200 видів папоротей впливають різні фактори навколишнього середовища, серед яких освітлення, температура, наявність елементів живлення, гравітація тощо [7–12]. Показано також, що екзогенні фітогормони, такі як гібереліни, антеридіогени, етилен, брасиностероїди, жасмонова кислота та цитокініни здатні регулювати процес проростання спор папоротей [12–17]. Разом з цим, виявилось, що екзогенні фітогормони впливають і на морфогенез, розвиток та статевий поліморфізм гаметофітів. Зокрема, високі концентрації гіберелової кислоти (ГКЗ) пригнічують ріст проталія *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw., тоді як низькі не впливають на його розвиток [18], або сприяють розтягуванню клітин [19]. В апікальній та антеридіальній зонах проталія *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. ГКЗ індукує поділ та збільшення розмірів клітин [20]. Жасмонова кислота стимулює перехід гаметофітів *Platyserium bifurcalum* (Cav.) C. Chr. від нитчастої до лопаткоподібної форми, збільшує кількість ризоїдів, активує поділ клітин [14]. У *Anemia tomentosa* (Savigny)

© К.О. РОМАНЕНКО, І.В. КОСАКІВСЬКА,
Л.М. БАБЕНКО, О.В. ВАШЕКА, П.О. РОМАНЕНКО,
В.А. НЕГРЕЦЬКИЙ, В.М. МІНАРЧЕНКО, 2019

Swartz var. *anthriscifolia* (Schrader) Mickel жасмонова кислота сприяє розвитку спорофітів [21]. Екзогенна індолілоцтова кислота, навпаки, не впливає на розвиток гаметофіта цієї папороті [21]. Показано, що синтетичні ауксини сприяють подовженню клітин та індують розвиток нитчастого талому гаметофітів [19, 22], а в комбінації з абсцизовою кислотою цей вплив нівелюється, внаслідок чого розвиваються пластинчасті таломі [19].

Переважає більшість папоротей — рівноспорові рослини, тобто у їх спорангіях утворюються спори одного типу, які дають початок потенційно двостатевому гаметофіту [7]. Разом з тим, повідомляється, що в природних а також лабораторних популяціях рівноспорових папоротей розвиваються чоловічі і жіночі гаметофіти, або взагалі безстатеві індивіди [23]. З'ясовано, що ключову роль у формуванні статевого поліморфізму папоротей відіграють гібереліни та гібереліноподібний гормон антеридіоген [24]. Екзогенна обробка гіберелінами в більшості випадків активує утворення антеридіїв та сповільнює розвиток архегоніїв [18, 20, 24–26]. Екзогенні ж ауксини в культурі *in vitro* індують апогамний розвиток спорофітів із стерильних (безстатевих) гаметофітів [27].

Цитокініни використовують для регуляції росту при мікроклональному розмноженні, культивуванні та вкоріненні спорофітів в культурі *in vitro* [28–34]. Ці фітогормони контролюють поділ клітин, стимулюють утворення та активність меристем пагонів, формують атрагуючу спроможність тканин, затримують процес старіння листків, інгібують ріст та галуження кореня, беруть участь в регуляції процесу проростання насіння, формуванні відповіді на стресові впливи тощо [35–37]. До класу цитокінінів належать похідні аденіну, сполуки близькі за структурою, але з різною біологічною активністю й нерівнозначними функціями. Молекули гормону з певними варіаціями структури бічного ланцюга, вірогідно, медіюють різні біологічні сигнали: на сьогодні встановлена участь *транс*-зеатину та ізопентеніладеніну в передачі довгодистанційних сигналів в акропетальному та базипетальному напрямках відповідно [38]. Цитокініни задіяні у формуванні статі покритонасінних рослин. Так, чоловічу стерильність кукурудзи вдається подолати завдяки застосу-

ванню екзогенних фітогормонів цього класу [39]. Цитокініни необхідні для розвитку пиляків і пилку [40].

Впливу цитокінінів на морфогенез спорофітів папоротей присвячена значна кількість досліджень [34, 41–45]. Показано, що цитокініни пригнічують розвиток гаметофітів, зменшують розміри, або спричиняють чисельні розростання і деформації серцеподібного талому, впливають на утворення гамет [46–48]. Встановлено, що цитокініни індують фотоморфогенез у вирощених без освітлення гаметофітів, впливають на швидкість росту, поділ, розтягування та диференціацію клітин [49]. Разом з тим, роль цитокінінів в регуляції морфогенезу та реалізації статевого диморфізму гаметофітів в культурі *in vitro*, а також оптимізації процесу проростання спор папоротеподібних залишається малодослідженою. Зауважимо, що гаметофіти папоротей належать до модельних об'єктів, ідеально придатних для вивчення впливу екзогенних факторів. Вони вирізняються простотою будови і невибагливістю до умов культивування *in vitro* [7, 33]. Ізольовані гаметофіти папоротей успішно використовуються для вивчення генетичних та фізіологічних механізмів регуляції росту й розвитку, що сприяє отриманню нових знань про еволюцію наземних рослин [50]. До перспективних екзогенних регуляторів росту для вирощування в культурі *in vitro* декоративних та зникаючих видів папоротей відносяться фітогормони цитокінінового ряду, про що повідомлялося в роботах [30, 33, 48, 51]. Вивчення впливу екзогенних цитокінінів дозволяє визначити роль цих гормонів в регуляції росту та розвитку гаметофітів [47]. Тому метою нашої роботи стало вивчення впливу фітогормонів цитокінінової природи на характер проростання спор, морфологію й особливості розвитку гаметофіта *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott у культурі *in vitro* для з'ясування можливостей подальшого використання екзогенних цитокінінів для управління цими процесами.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були спори та гаметофіти лептоспорангіатної папороті флори України щитника чоловічого (*Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, родина Dryopteridaceae). Рослини зростали на експозиційній

ділянці вищих спорових рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна в м. Києві. Спори збирали з кінця червня до середини липня. Фертильні листки зрізали і зберігали в паперових пакетах у сухих умовах до висипання спор (зазвичай через тиждень). Спори відділяли від фрагментів листків і спорангіїв струшуванням і зберігали при температурі +20 °С. Перед посівом спори промивали стерильною дистильованою водою, центрифугували 15 хв при 9000 об/хв, витримували у 40 % етиловому спирті 1,5 хв, тричі промивали стерильним дистильованим, після чого проводили посів на стерильне рідке живильне середовище Кнопа в чашки Петрі. Спори пророщували при +22–25 °С, щільності фотонного потоку 35–40 мкМ/м²·с⁻¹, фотоперіод складав 16 : 8 (день : ніч), рН середовища 5,8–6,0. Спостереження проводили відповідно до стадій розвитку гаметофіта, які визначали за двома термінами: від появи перших екземплярів до максимальної кількості екземплярів, що знаходились в певній фазі розвитку. Екзогенні фітогормони з групи цитокінінів – кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин (БАП), N⁶-2-ізо-пентеніладенін (іП) – вносили в живильне середовище Кнопа безпосередньо перед посівом спор у концентраціях 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ М. За контроль слугувало середовище Кнопа без додавання фітогормонів.

Оскільки проростання спор *D. filix-mas* в культурі *in vitro* розпочинається на 7–8 день з моменту посіву, а повне проростання життєздатних спор завершується на 13 добу, вплив фітогормонів фіксували саме в цей період часу. За допомогою камери Богорова рахували кількість пророслих і непророслих спор. Кількість пророслих спор вираховували по відношенню до непророслих, у відсотках. Морфологічні зміни у розвитку гаметофітів під впливом екзогенних фітогормонів фіксували на трьох стадіях розвитку: 1 – лопаткоподібного проталія (30 день з моменту посіву спор), 2 – серцеподібного талому (80 день з моменту посіву спор), 3 – утворення спорофіта (120 день з моменту посіву спор).

Спостереження за проростанням спор та розвитком гаметофітів здійснювали з використанням біокулярного мікроскопу МБС-9 (СРСР). Морфологію спор і гаметофітів дос-

ліджували за допомогою сканувального електронного мікроскопу JEOL JSM-6060 LA (Японія) і світлового мікроскопу Carl Zeiss Primo Star (Німеччина). Розміри талому гаметофіта визначали за програмою AxioVision Rel. 4,8. Всі досліді проводили в трьох біологічних і аналітичних повторях. Отримані результати статистично обробляли у програмі Excel стандартного пакету Microsoft Office 2013. Достовірність різниці оцінювали за *t*-критерієм Стюдента, використовуючи 5 % рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення.

1. Вплив екзогенних цитокінінів на проростання спор. Спори *D. filix-mas* білатеральні, однопроменеві, ниркоподібної форми, в екваторіальній площині плоско-опуклі або опукло-вигнуті. Периспорій зморшкуватий, хвилясто-складчастий, з бородавчастими виростами та поодинокими гребнями. Довжина спори разом з периспорієм в бічному положенні $49,5 \pm 0,9$ мкм, ширина $37,1 \pm 0,6$ мкм (рис. 1). З урахуванням морфологічних ознак периспорія, спори даного виду віднесено до бородавчато-складчастого типу [52].

Нами було встановлено, що всі екзогенні цитокініни в концентрації 10⁻⁵ М суттєво гальмували проростання спор (рис. 2). Найбільшим інгібітором виявився іП, гальмівний вплив якого прямо пропорційно залежав від концентрації. Кінетин також гальмував проростання спор, причому як найбільша (10⁻⁵ М) так і найменша (10⁻⁸ М) його концентрації проявляли максимальну інгібуючу дію, тоді як проміжні концентрації (10⁻⁶ М та 10⁻⁷ М) виявляли меншу активність. Концентрація БАП 10⁻⁸ М суттєво не впливала на проростання спор, тоді як при її збільшенні проростання гальмувалось. Зеатин у низьких концентраціях позитивно впливав на проростання спор, найбільш ефективною виявилася концентрація 10⁻⁷ М (рис. 2).

2. Морфологічні зміни гаметофітів під впливом екзогенних цитокінінів на різних стадіях розвитку. **2.1. Стадія лопаткоподібного проталія.** Контрольні зразки формували асиметричний проталій (рис. 3, а). Кількість клітин талому складала 20–45 шт., кількість ризоїдів 1–4, частіше 2 (таблиця). Розвиток проталія відбувався за *Aspidium*-типом, характерним для папоротей з родини Dryopteridaceae [53].

Екзогенні іП, БАП та зеатин у концентрації 10^{-5} М блокували формування нормальної протонеми (рис. 3, б, в, г). Найбільш виражений вплив мав іП: протонеми склалися з 3–12 клітин, переважно з бічним галузненням від першої проталіальної клітини, ризоїди не розвивались, були наявні лише їхні зачатки на 2–3 проталіальних клітинах (рис. 3, б, таблиця). Під впливом БАП та зеатину протонеми набували ниткоподібної форми, склалися з 10–25 клітин. Протонеми лопаткоподібної форми з бічними відгалуженнями спостерігалися зрідка. В значній кількості формувалися невеликі ризоїди (рис. 3, в, г). Кінетин активував розвиток ризоїдів і зменшував кількість клітин проталія, через що «лопатка» виглядала більш компактною (рис. 3, д, таблиця).

Екзогенний зеатин в концентрації 10^{-6} М викликав значне розростання проталія в ширину (рис. 3, е), тоді як БАП, кінетин та іП, у цій самій концентрації суттєво не впливали на морфогенез гаметофіта (рис. 3, ж, з, і). Під впливом усіх екзогенних цитокінінів відбувався активний розвиток ризоїдів, які були коротші за контрольні, але переважали кількісно (рис. 3, е–і, таблиця).

Екзогенні зеатин та кінетин у концентрації 10^{-7} М, на відміну від іП та БАП, прискорювали розростання «лопатки» проталія за рахунок активації ініціальної клітини (рис. 3, к, л), яка знаходилась в центральній частині його верхівки. Такі гаметофіти були сформовані з більшої кількості клітин (таблиця). Зеатин, кінетин та БАП у концентрації 10^{-7} М стимулювали розвиток і ріст ризоїдів (рис. 3, к, л, н), проте іП у такій самій концентрації хоча і активував їхній розвиток, проте затримував ріст (рис. 3, м).

Усі екзогенні цитокініни в концентрації 10^{-8} М активували поділи ініціальної клітини на верхівці лопаткоподібного проталія, за рахунок чого переважна більшість проталіїв була сформована з більшої кількості клітин (рис. 3, п–т, таблиця). Під дією іП в концентрації 10^{-8} М відбувалося формування серцеподібного талому і утворення виїмки (рис. 3, п), при цьому нерідко спостерігали й деформовану проталіальну «лопатку». Зеатин у найменшій концентрації виявив сильну стимулюючу дію, яка проявилася в розростанні проталіальної плас-

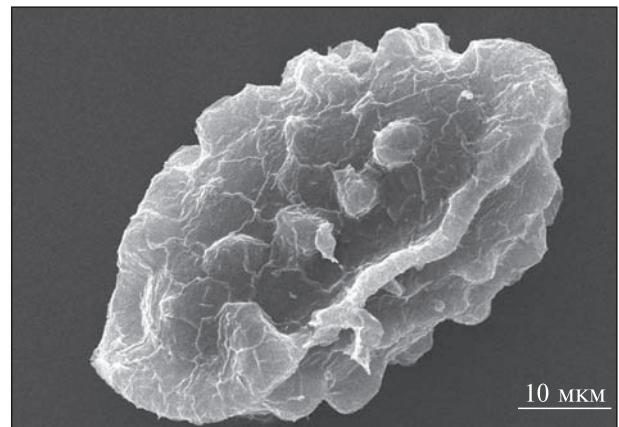


Рис. 1. Загальний вигляд спори *D. filix-mas* (СЕМ)

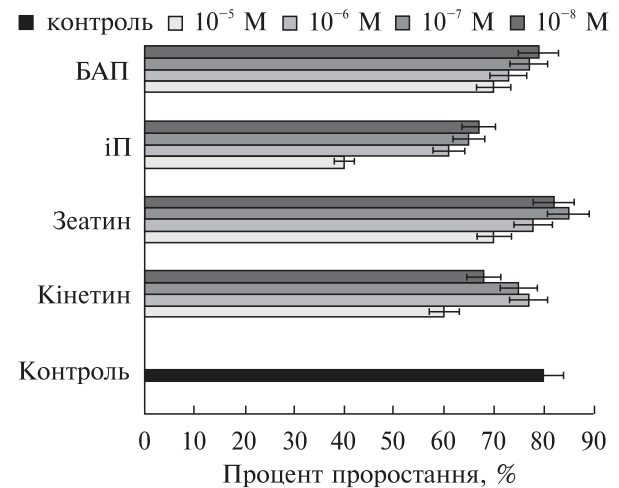


Рис. 2. Вплив екзогенних цитокінінів на проростання спор *D. filix-mas*

тинки серцеподібної форми, утворенні виїмки та початку формування двомірної меристеми (рис. 3, р). Усі цитокініни у концентрації 10^{-8} М активували ріст і розвиток ризоїдів, найбільш ефективними виявилися БАП та зеатин (таблиця).

2.2. Стадія серцеподібного талому. Контрольні зразки мали форму серцеподібної пластинки із симетричними крилами (рис. 4, а, таблиця). Зазвичай гаметофіти *D. filix-mas* двостатеві: на їхньому таломі розвиваються антеридії та архегонії [54]. У контролі архегоніальна подушка була добре сформована, на ній починали розвиватися перші архегонії. Поодинокі антеридії були розташовані по краю талому.

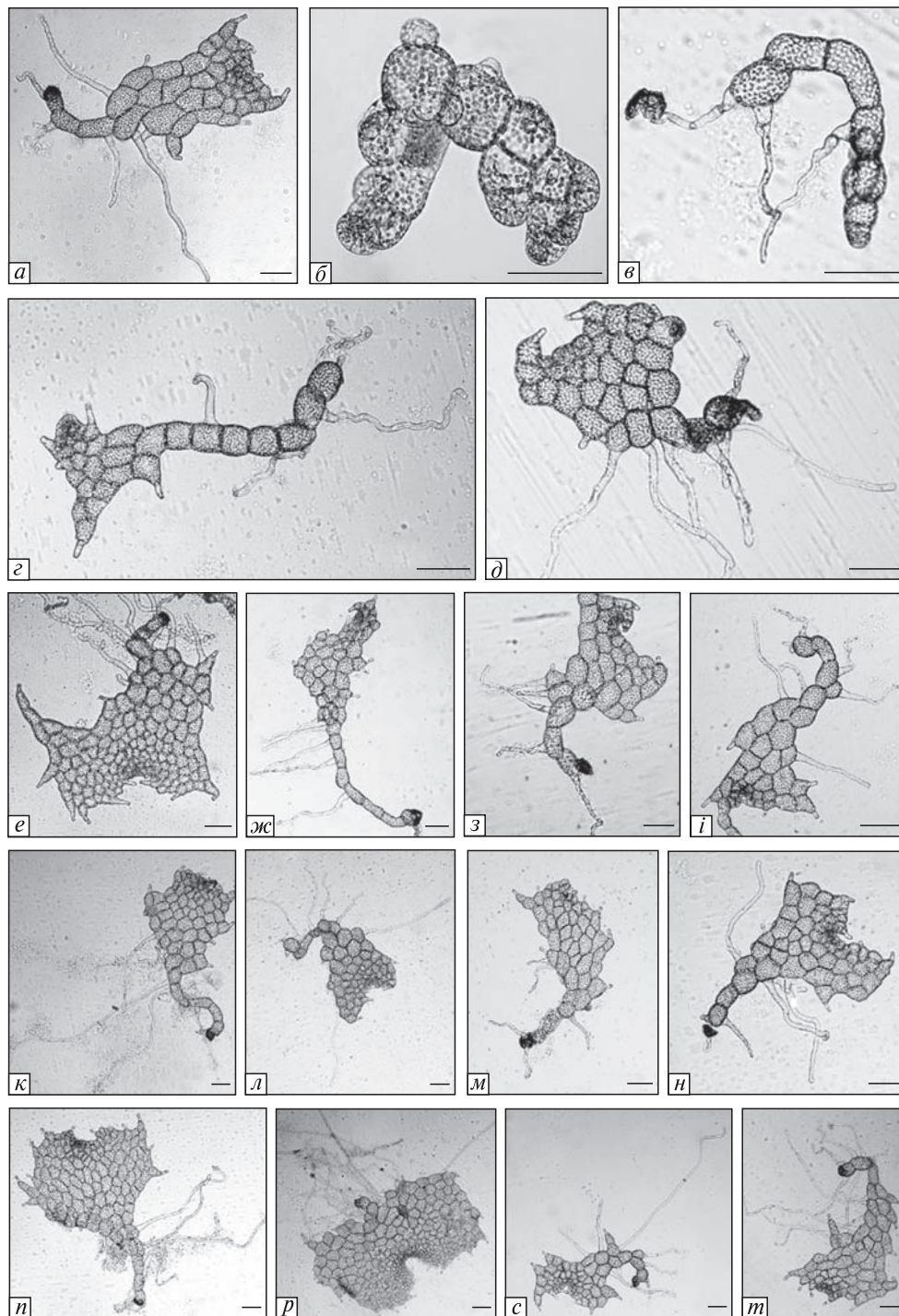


Рис. 3. Вплив екзогенних цитокінінів різних концентрацій на розвиток лопаткоподібного проталія *D. filix-mas*: а – контроль; б – іП (10^{-5} М); в – БАП (10^{-5} М); г – зеатин (10^{-5} М); д – кінетин (10^{-5} М); е – зеатин (10^{-6} М); ж – БАП (10^{-6} М); з – кінетин (10^{-6} М); и – іП (10^{-6} М); к – зеатин (10^{-7} М); л – кінетин (10^{-7} М); м – іП (10^{-7} М); н – БАП (10^{-7} М); о – іП (10^{-8} М); п – зеатин (10^{-8} М); р – кінетин (10^{-8} М); т – БАП (10^{-8} М). Масштаб – 100 мкм

Вплив екзогенних цитокінінів на морфогенез гаметофіта *D. filix-mas*

Особливості розвитку гаметофіта <i>in vitro</i>	Конт-роль	Зеатин				Кінетин				іП				БАП			
		10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁸ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁸ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁸ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁸ М
Стадія проталія																	
Форма проталія	Лп	Нп, Лп з/д	Лп	Сп	Лп	Лп	Лп	Лп	Лп	Рг	Лп	Лп	Лп	Нп, Лп з/д	Лп	Лп	Лп
Кількість клітин	20–45	12–25	25–60	30–65	≥100	12–28	35–45	35–60	35–60	3–12	15–35	18–45	≥80	6–23	17–38	24–42	35–50
Кількість ризоїдів	1–4	3–6	4–8	5–8	7–18	4–6	4–6	5–7	5–9	–	3–6	3–8	5–9	2–5	2–6	4–7	4–9
Стадія талому																	
Форма талому	Сп б/д	Сп з/д	Сп з/д	Сп з/д	Сп	Сп з/д	Сп з/д	Сп, Лп з/д	Сп	Рг	Лп, Ст з/д	Лп з/д	Лп, Сп з/д	Сп, Лп з/д	Сп, Лп, Ст, з/д	Сп, Лп	Сп
Антеридії	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+
Архегонії	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Розвиток спорофіта	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+

Примітка. Рг – розгалужена форма; Сп – серцеподібна форма; Лп – лопаткоподібна форма; Ст – стрічкоподібна форма; Нп – ниткоподібна форма; з/д – з деформаціями; б/д – без деформацій.

Екзогенний іП у концентрації 10^{-5} М блокував розвиток нормальної проталіальної пластинки. Спостерігалось сильне розгалуження талому, котре відбулося завдяки стимуляції гормоном множинного апікального домінування з утворенням багатьох ініціальних клітин, після поділу яких утворювались чисельні бічні проліферації, що формували розгалужену протонему (рис. 4, б). Зеатин у концентрації 10^{-5} М сприяв розростанню проталіальної пластинки, через що серцеподібний талом був сильно деформованим (рис. 4, в). При цьому відбувалось формування виїмки і багатоклітинної меристеми, проте розвиток архегоніальної подушки пригнічувався. Екзогенні 10^{-5} М кінетин та БАП також викликали деформацію серцеподібного талому: проталіальні пластинки набували лопаткоподібної форми з ледь помітною виїмкою або зі значними боковими розростаннями (рис. 4, г, д). Статеві органи (архегонії та антеридії) за дії 10^{-5} М усіх досліджених цитокінінів не формувалися (таблиця). В усіх варіантах дослідів, за винятком іП, у гаметофітів були розвинуті ризоїди.

У зразках із концентрацією іП 10^{-6} М серцеподібна форма талому була відсутня, гаметофіти, як правило, набували сильно витягнутої, лопаткоподібної або стрічкоподібної форми з багаточисельними бічними розростаннями (рис. 4, е). За дії 10^{-6} М зеатину, кінетину та БАП гаметофіти були подібні до контрольних (рис. 4, ж–і). Переважала серцеподібна форма талому. Під впливом 10^{-6} М зеатину і кінетину спостерігали також поодинокі деформовані гаметофіти з бічними відгалуженнями (рис. 4, ж, з), а за дії БАП – витягнуті лопаткоподібні чи стрічкоподібні з бічними розростаннями (рис. 4, і). Під впливом 10^{-6} М БАП та іП було відмічено формування поодиноких антеридіїв (таблиця). У концентрації 10^{-6} М кінетин не сприяв формуванню чоловічих і жіночих статевих органів на поверхні талому, тоді як зеатин тієї ж концентрації стимулював утворення поодиноких архегоніїв виключно на сформованих серцеподібних таломових (таблиця).

У досліді з екзогенним 10^{-7} М іП серцеподібна форма талому не утворювалась, переважали сильно витягнуті лопаткоподібні таломові, часто розширені на верхівці; зустрічалися де-

формовані таломові з ниткоподібними розгалуженими відростками (рис. 4, к). У досліді з 10^{-7} М зеатином спостерігали серцеподібну форму талому з сильним розростанням в основі (рис. 4, л). При концентрації 10^{-7} М кінетину та БАП форма талому була подібна до контролю, але часто із рваним краєм (рис. 4, м, н). Проте нерідко в обох дослідів зустрічалися й витягнуті лопаткоподібні таломові. У досліді з 10^{-7} М іП активний розвиток антеридіїв відбувався як на поверхні стрічкоподібного талому (рис. 5, а), так і на бічних ниткоподібних відростках (рис. 5, б). Розвиток архегоніїв не встановлений. На видовжених таломових гаметофітів у досліді із 10^{-7} М БАП виявлені поодинокі антеридії, на серцеподібних й лопаткоподібних таломових архегоніїв не були знайдені. На таломових гаметофітів при дії 10^{-7} М зеатину та кінетину були виявлені жіночі й чоловічі гаметангії в незначній кількості (таблиця).

За дії 10^{-8} М іП розвивалися таломові сильно видовженої лопаткоподібної або серцеподібної форми (рис. 4, п). Гаметофіти з видовженою серцеподібною формою талому мали добре розвинену виїмку та архегоніальну подушку, на якій розвивалися архегонії, тоді як на видовженій частині талому, ближче до основи активно формувалися антеридії. Гаметофіти за дії 10^{-8} М зеатину, кінетину та БАП були подібні до контрольних, поодинокі спостерігалися серцеподібні таломові з нерівним краєм (рис. 4, р, с, т). Активний розвиток архегоніїв і повільний антеридіїв відмічений у досліді із використанням зеатину та кінетину (10^{-8} М), тоді як БАП у найменшій концентрації сприяв активному утворенню виключно антеридіїв (таблиця).

2.3. Стадія утворення спорофітів. На 120 добу з моменту висіву спор відмічено розвиток перших спорофітів на поверхні серцеподібних таломів у контролі. Встановлено, що найвищі концентрації (10^{-5} та 10^{-6} М) усіх використаних в досліді цитокінінів пригнічували утворення спорофітів, що відбувалось через затримку у формуванні нормального талому, інгібування розвитку статевих структур, а також гальмування росту сформованих спорофітів. За умови зменшення концентрації усіх, за виключенням іП, цитокінінів (10^{-7} М), спостерігалось

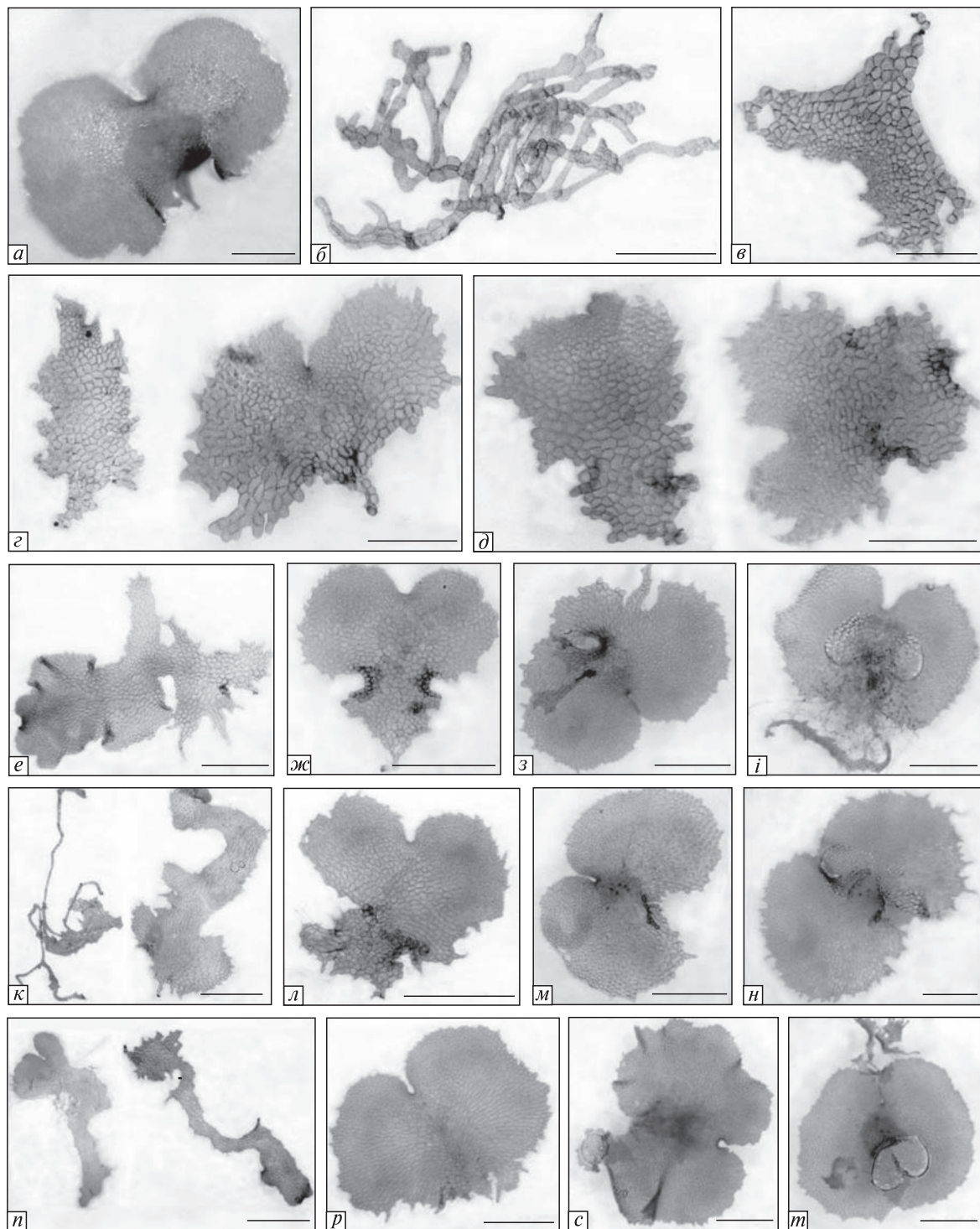


Рис. 4. Вплив екзогенних цитокінінів на розвиток серцеподібного талому *D. filix-mas*: *a* – контроль; *б* – іП (10^{-5} М); *в* – зеатин (10^{-5} М); *г* – БАП (10^{-5} М); *д* – кінетин (10^{-5} М); *е* – іП (10^{-6} М); *ж* – зеатин (10^{-6} М); *з* – кінетин (10^{-6} М); *и* – БАП (10^{-6} М); *к* – іП (10^{-7} М); *л* – зеатин (10^{-7} М); *м* – кінетин (10^{-7} М); *н* – БАП (10^{-7} М); *п* – іП (10^{-8} М); *р* – зеатин (10^{-8} М); *с* – кінетин (10^{-8} М); *т* – БАП (10^{-8} М). Масштаб – 100 мм

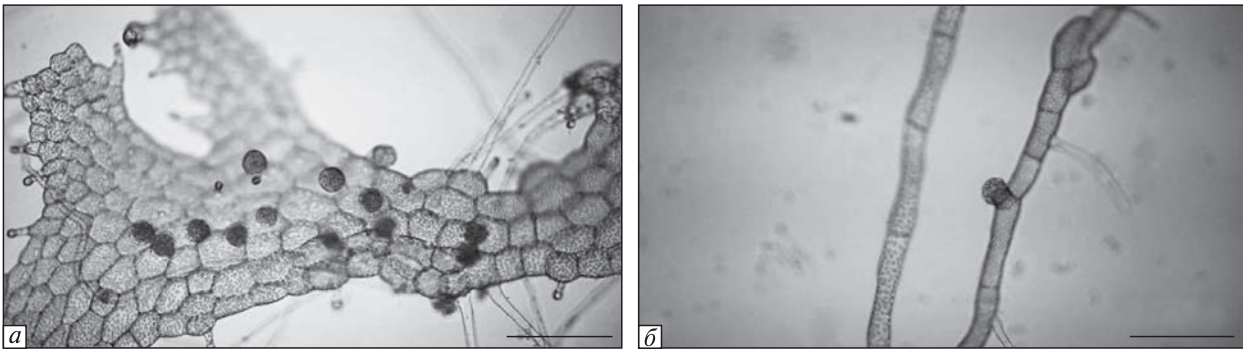


Рис. 5. Розвиток антеридіїв за дії ізопентеніладеніну в концентрації 10^{-7} М на поверхні стрічкоподібного талому (а) та ниткоподібних відростках (б)

формування поодиноких спорофітів (таблиця). За найменшої концентрації цитокинінів (10^{-8} М) відбулося формування й розвиток спорофітів. У порівнянні з контролем усі спорофіти були менші за розміром, спостерігалася затримка їхнього росту і розвитку. Лише у досліді з зеатином розвиток спорофітів не відрізнявся від контролю, а їх кількість переважала контрольні зразки.

Наші дослідження показали, що високі концентрації цитокинінів інгібують проростання спор та розвиток гаметофітів *D. filix-mas*, сприяють формуванню деформованих таломів, пригнічують утворення статевих органів та спорофіта. Низькі концентрації цитокинінів переважно пришвидшують розвиток гаметофітів, що проявляється у ранньому формуванні серцеподібного талому, проте в залежності від ізоформи гормону по-різному впливають на характер деформації та статеву диференціацію. Встановлено, що екзогенні цитокиніни активують розвиток і ріст ризоїдів, причому ступінь стимулювання збільшується залежно від концентрації гормонів у живильному середовищі. Екзогенні цитокиніни негативно впливали на утворених двостатевих гаметофітів. У попередньому дослідженні нами був проаналізований вплив екзогенного БАП на проростання спор та морфогенез гаметофіта *Polystichum aculeatum* (L.) Roth. Показано, що високі концентрації гормону суттєво гальмували проростання спор та сповільнювали розвиток гаметофіта на стадії протонеми за рахунок зняття апікального домінування. Ступінь впливу залежала від концентрації гормону в живильному се-

редовищі [16]. В роботах інших дослідників повідомлялося, що вплив БАП у концентраціях гормону 0,01; 0,1; 1,0 мг/л на проростання спор *Alsophila odonelliana* (Alston) Lehnert в культурі *in vitro* був слабовираженим [48]. Значне зменшення розмірів проталія гаметофітів у *Ceratopteris richardii* Brongn. та пригнічення процесів формування серцеподібного талому й утворення гаметангіїв у *Blechnum spicant* (L.) Sm. були виявлені після екзогенної обробки гаметофітів мікро-, нано- і субнаномольними концентраціями БАП [46, 49]. За умови збільшення концентрації кінетину (10^{-8} , 10^{-5} , 10^{-3} М) спостерігалася зменшення розмірів серцеподібного талому гаметофіта *Osmunda regalis* L. і відбувалася деформація виїмки між його крилами [47]. В той же час, БАП, кінетин та іП індукували фотоморфогенез гаметофітів *Ceratopteris richardii*, вирощених без освітлення [49]. При концентраціях 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-12} М, кожний з цих фітогормонів змінював швидкість поділу клітин, сприяв подовженню та диференціації клітин, індукував перехід від нитчастого до проталіального росту, який виникає при дії світла, активував утворення виїмки в апікальній зоні меристеми та ризоїдів у її нижній зоні [49]. При вирощуванні гаметофітів *Alsophila odonelliana* в культурі *in vitro* показано, що БАП, незалежно від його концентрації, впливав на утворення ниткоподібних гаметофітів та сприяв формуванню розгалуженого талому на стадії лопаткоподібного проталія, а в подальшому індукував утворення багаточисельних поліферацій талому [48]. Відомо, що БАП та іП індукують розвиток багаточисельних пазушних

пагонів рослин [55]. А у випадку із гаметофітами папоротей, ці гормони активують множинне апікальне домінування меристеми талому.

Отже, проведені нами дослідження та аналіз літературних джерел показали, що використання екзогенних цитокінінів у високих концентраціях гальмує проростання спор папоротей, на всіх стадіях розвитку затримує ріст гаметофітів, викликає деформацію таломів та зменшення їхніх розмірів, інгібує розвиток статевих органів та спорофітів. Зменшення концентрації фітогормонів цитокінінової природи сприяє розвитку гаметофітів, індукуює поділ клітин, особливо апікальної зони, що спричиняє появу таломів деформованої форми, активує утворення ризоїдів, проте по-різному впливає на формування антеридіїв та архегоніїв і розвиток спорофітів.

Висновки. Уперше досліджено вплив різних концентрацій екзогенних фітогормонів цитокінінової природи: зеатину, кінетину, бензиламінопурину та ізопентеніладеніну на проростання спор, морфогенез гаметофіта та утворення спорофіта в культурі *in vitro* лептоспорангіатної папороті *D. filix-mas*. Виявлено, що високі (10^{-5} , 10^{-6} М.) і низькі (10^{-7} , 10^{-8} М) концентрації кінетину, БАП та іП гальмували проростання спор. Найбільшим інгібітором виявився іП. Зеатин у концентраціях 10^{-7} та 10^{-8} М позитивно впливав на проростання спор. За дії високих концентрацій цитокінінів сповільнювався розвиток протонеми, утворювалися деформовані серцеподібні таломі, повністю пригнічувався розвиток статевих органів та спорофіта. Низькі концентрації цитокінінів сприяли збільшенню кількості клітин проталія та залежно від ізоформи гормону по-різному впливали на деформації серцеподібного талому та статеву диференціацію. Встановлено, що екзогенні цитокініни активували розвиток і ріст ризоїдів, причому ступінь стимулювання збільшувався залежно від концентрації гормонів у живильному середовищі. Виявлено, що цитокініни в цілому пригнічували ріст і розвиток спорофітів, що обумовлено зменшенням кількості утворюваних двостатевих гаметофітів. Екзогенний іП в усіх концентраціях найінтенсивніше впливав на морфогенез гаметофіта на всіх стадіях розвитку: у найвищій кон-

центрації блокував розвиток протонеми, у найнижчій — розвиток серцеподібного талому. Зеатин у найменших концентраціях стимулював розвиток гаметофітів, мінімізував появу деформацій талому, активував ріст і розвиток багаточисельних ризоїдів, пришвидшував появу статевих структур та перших спорофітів.

Публікація містить результати досліджень, проведених в рамках наукової роботи №: III-71-14.431 «Гормональний контроль росту та розвитку спорових рослин (різної таксономічної належності)» (державний реєстраційний номер роботи 0114U002034).

EFFECTS OF EXOGENOUS CYTOKININS ON SPORE GERMINATION AND GAMETOPHYTE MORPHOGENESIS OF *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.) SCHOTT *IN VITRO* CULTURE

K.O. Romanenko, I.V. Kosakivska,
L.M. Babenko, O.V. Vasheka, P.O.
Romanenko, V.A. Negretsky, V.M. Minarchenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, 01601, Ukraine
Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv,
2, Hlushkova Avenue, Kyiv, 03127, Ukraine
Bogomolets National Medical University
13, T. Shevchenko blvd., Kyiv, 01601, Ukraine

E-mail: katernaromanenko4@gmail.com,
irynakosakivska@gmail.com, lilia.babenko@gmail.com,
olena.vasheka@gmail.com, petrrom@ukr.net,
negretsky@ukr.net, valminar@ukr.net

The effects of exogenous cytokinin phytohormones: kinetin, zeatin, 6-benzylaminopurine, N⁶-2-isopentenyladenine on the pattern of spore germination as well as gametophyte morphology and growth features of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott *in vitro* culture have been studied. It was established that at the concentration of 10^{-5} M all studied cytokinins significantly retarded spore germination, inhibited gametophyte growth, caused deformations and changes in the thallus size, suppressed the development of reproductive structures and sporophyte growth. The reduction of the hormone concentration to 10^{-8} M stimulated the gametophyte development, induced cell divisions, particularly in the apical zone, due to which some of thalli were deformed, promoted the production of rhizoids, affected the formation of antheridia and archegonia and slowed the sporophyte development.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЦИТОКИНИНОВ
НА ПРОРАСТАНИЕ СПОР И МОРФОГЕНЕЗ
ГАМЕТОФИТА *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.)
SCHOTT В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Е.А. Романенко, І.В. Косаковская,
Л.М. Бабенко, Е.В. Вашека, П.А. Романенко,
В.А. Негрецкий, В.Н. Минарченко

Исследовано влияние экзогенных фитогормонов цитокининовой природы: кинетина, зеатина, 6-бензил-аминопурина, N⁶-2-изопентениладенина на характер прорастания спор, морфологию и особенности роста гаметофита *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott в культуре *in vitro*. Установлено, что в концентрации 10⁻⁵ М все исследованные цитокинины существенно тормозили прорастание спор, задерживали рост гаметофита, вызывали деформацию и уменьшение размеров таллома, подавляли развитие половых структур и рост спорофита. Уменьшение концентрации гормонов до 10⁻⁸ М стимулировало развитие гаметофита, индуцировало деление клеток, особенно в апикальной зоне, в следствии чего талломы приобретали деформированную форму, активировало образования ризоидов, влияло на формирование антеридиев и архегониев и задерживало развитие спорофита.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Kosakivska, I.V., Babenko, L.M., Shcherbatiuk, M.M., Vedenicheva, N.P., Voytenko, L.V., and Vasyuk, V.A., Phytohormones during growth and development of Polypodiophyta, *ABES*, 2016, vol. 1, pp. 26–44.
- Davies, P. J., (Ed.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed., Springer Netherlands, 2010. doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7.
- Fonseca, S., Rosado, A., Vaughan-Hirsch, J., Bishop, A., and Chini, A., Molecular locks and keys: the role of small molecules in phytohormone research. *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, art. 709, pp. 1–16. doi.org/10.3389/fpls.2014.00709.
- Wang, Y.H., Irving, H.R., Developing a model of plant hormone interactions, *Plant Signal. Behav.*, 2011, vol. 6, pp. 494–500. doi.org/10.4161/psb.6.4.14558.
- Wells, D.M., Laplace, L., Bennett, M.J., and Vernoux, T., Biosensors for phytohormone quantification: challenges, solutions, and opportunities, *Trends Plant Sci.*, 2013, vol. 18, pp. 244–9. doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.005.
- Borghi, L., Kang, J., Ko D., Lee, Y., and Martinoia, E., The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport, *Biochem. Soc. Trans.*, 2015, vol. 43, pp. 924–30. doi.org/10.1042/BST20150106.
- Raghavan, V., *Developmental Biology of Fern Gametophytes*, Cambridge University Press, 1989. doi.org/10.1017/CBO9780511529757.
- Du, H., Li, Y., Li, D., Dai, S., Jiang, C., and Shi, L., Effects of light, temperature and pH on spore germination and early gametophytic development of *Alsophila metteniana*, *Biodiv. Sci.*, 2009, vol. 17, pp. 182–7. doi.org/10.3724/SP.J.1003.2009.08262.
- Juárez-Orozco, S., Orozco-Segovia, A., Mendoza-Ruiz, A., and Pérez-García, B., Spore germination of eight homosporous ferns in a temperature gradient, *S. Afr. J. Bot.*, 2013, vol. 87, pp. 112–7. doi.org/10.1016/j.sajb.2013.04.005.
- Edwards, E.S., Roux, S.J., Influence of gravity and light on the developmental polarity of *Ceratopteris richardii* fern spores, *Planta*, 1998, vol. 205, pp. 553–60. doi.org/10.1007/s004250050355.
- Wu, H., Liu, X.-Q., Ji H., and Chen, L.-Q., Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae), *Sci. Hortic.*, 2010, vol. 125, pp. 417–21. doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.004.
- Suo, J., Chen, S., Zhao, Q., Shi, L., and Dai, S., Fern spore germination in response to environmental factors, *Front. Biol.*, 2015, vol. 10, pp. 358–76. doi.org/10.1007/s11515-015-1342-6.
- Edwards, M.E., Carbon dioxide and ethylene control of spore germination in *Onoclea sensibilis* L. *Plant Physiol.*, 1977, vol. 59, pp. 756–8. doi.org/10.1104/pp.59.4.756.
- Camloh, M., Ravnkar, M., and Zel, J., Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation of rhizoids and early development of gametophytes, *Physiol. Plant.*, 1996, vol. 97, pp. 659–664. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00529.x.
- Chia, S.-G.E., Raghavan, V., Absciscic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern, *Mohria caffrorum*, *New Phytol.*, 1982, vol. 92, pp. 31–37. doi.org/10.1111/j.1469-8137.1982.tb03360.x.
- Babenko, L.M., Romanenko, K.O., Shcherbatiuk, M.M., Vasheka, O.V., Romanenko, P.O., Negretsky, V.A., and Kosakivska, I.V., Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte in vitro culture, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, pp. 117–26. doi.org/10.3103/S0095452718020032.
- Gymez-Garay, A., Galán, J.M.G., Cabezuelo, A., Pintos, B., Prada, C., and Martín L., Ecological significance of brassinosteroids in three temperate ferns, In *Current Advances in Fern Research*, Springer, Cham., 2018, pp. 453–66. doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_21.
- Takeno, K., Furuya, M., Inhibitory effect of gibberellins on archegonial differentiation in *Lygodium japonicum*, *Physiol. Plant.*, 1977, vol. 39, pp. 135–8. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04024.x.

19. Swami, P., Raghavan, V., Control of morphogenesis in the gametophyte of a fern by light and growth hormones, *Can. J. Bot.*, 1980, vol. 58, pp. 1464–73. doi.org/10.1139/b80-179.
20. Kaźmierczak, A., Induction of cell division and cell expansion at the beginning of gibberellin A3-induced precocious antheridia formation in *Anemia phyllitidis* gametophytes, *Plant Sci.*, 2003, vol. 165, pp. 933–9. doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00217-6.
21. Castilho, C.V.V., Neto, J.F.F., Leitro, S.G., Barreto, S.C.P., and Silva N.C.B., *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* in vitro culture: sporophyte development and volatile compound profile of an aromatic fern, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2018, pp. 1–13. doi.org/10.1007/s11240-018-1383-z.
22. Miller, J.H., Fern gametophytes as experimental material, *Bot. Rev.*, 1968, vol. 34, pp. 361–440. doi.org/10.1007/BF02859133.
23. Korpelainen, H., Growth, sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott gametophytes under varying nutritional conditions, *Bot. J. Linn. Soc.*, 1994, vol. 114, pp. 357–66. doi.org/10.1006/bojl.1994.1022.
24. Atallah, N.M., Banks, J.A. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, art. 100, pp. 1–6. doi.org/10.3389/fpls.2015.00100.
25. Hollingsworth, S., Andres, E., and Greery, G., Pheromonal interactions among gametophytes of *Osmundastrum cinnamomeum* and the origins of antheridiogen systems in leptosporangiate ferns, *Int. J. Plant Sci.*, 2012, vol. 173, pp. 382–390. doi.org/10.1086/664717.
26. Menéndez, V., Revilla, M.A., Bernard, P., Gotor, V., and Fernández, H., Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L., *Plant Cell Rep.*, 2006, vol. 25, pp. 1104–10. doi.org/10.1007/s00299-006-0149-y.
27. Kwa, S. H., Wee, Y.C., Lim, T.M., and Kumar, P.P., IAA-induced apogamy in *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. gametophytes cultured in vitro, *Plant Cell Rep.*, 1995, vol. 14, pp. 598–602. doi.org/10.1007/BF00231946.
28. Higuchi, H., Amaki, W., and Suzuki, S., In vitro propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl., *Sci. Hortic.*, 1987, vol. 32, pp. 105–113. doi.org/10.1016/0304-4238(87)90021-5.
29. Fernández, H., Revilla, M.A., In vitro culture of ornamental ferns, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2003, vol. 73, pp. 1–13. doi.org/10.1023/A:1022650701341.
30. Bharati, S.K., Manabendra, D.C., and Mazumder, P.B., In vitro propagation in Pteridophytes, *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, 2013, vol. 4, pp. 297–303. doi.org/10.7897/2277-4343.04245.
31. Somer, M., Arbesú, R., Menéndez, V., Revilla, M.A., and Fernández, H., Sporophyte induction studies in ferns in vitro, *Euphytica*, 2010, vol. 171, pp. 203. doi.org/10.1007/s10681-009-0018-1.
32. Chen, S.Y., Read, P.E. Micropropagation of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*), *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1983, vol. 96, pp. 266–9.
33. Menéndez, V., Abul, Y., Bohanec, B., Lafont, F., and Fernández, H., The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the in vitro development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L., *Acta Physiol. Plant.*, 2011, vol. 33, pp. 2493–500. doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9.
34. Higuchi, H., Amaki, W., Effects of 6-benzylamino-purine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through in vitro propagation, *Sci. Hortic.*, 1989, vol. 37, pp. 351–9. doi.org/10.1016/0304-4238(89)90146-5.
35. Vedenicheva, N.P., Kosakivska, I.V., Modern aspects of cytokinins studies: evolution and crosstalk with other phytohormones, *Fiziologiy Rasteniy i Genetika*, 2016, vol. 48, pp. 3–19 (in Ukrainian).
36. Vedenicheva, N.P., Kosakivska, I.V., *Cytokinins as regulators of plant ontogenesis under different growth conditions*, Kyiv: Nash Format, 2017 (in Ukrainian).
37. Veselov, D.S., Kudoyarova, G.R., Kudryakova, N.V., and Kusnetsov, V.V., Role of cytokinins in stress resistance of plants, *Russ. J. Plant Physiol.*, 2017, vol. 64, pp. 15–27. doi.org/10.1134/S1021443717010162.
38. Kudo, T., Makita, No., Kojima, M., Tokunaga, H., and Sakakibara, H., Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-zeatin-o-glucosyltransferase in rice, *Plant Physiol.*, 2012, vol. 160, pp. 319–31. doi.org/10.1104/pp.112.196733.
39. Huang, S., Cerny, R.E., Qi, Y., Bhat, D., Aydt, C.M., Hanson, D.D., Malloy, K.P., and Ness, L.A., Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development, *Plant Physiol.*, 2003, vol. 131, pp. 1270–82. doi.org/10.1104/pp.102.018598.
40. Gerashchenkov, G.A., Rozhnova, N.A., The involvement of phytohormones in the plant sex regulation, *Russ. J. Plant Physiol.*, 2013, vol. 60, pp. 597–610. doi.org/10.1134/S1021443713050063.
41. Beck, M.J., Caponetti, J.D., The effects of kinetin and naphthaleneacetic acid on *in vitro* shoot multiplication and rooting in the fishtail fern, *Am. J. Bot.*, 1983, vol. 70, pp. 1–7. doi.org/10.2307/2443197.
42. Hicks, G., Aderkas, P.V., A tissue culture of the Ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1986, vol. 5, pp. 199–204. doi.org/10.1007/BF00040130.
43. Amaki, W., Higuchi, H., A possible propagation sys-

- tem of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum* and *Rumora* through tissue culture, *Acta Hort.*, 1991, vol. 300, pp. 237–43. doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.300.33.
44. Fernández, H., Bertrand, A.M., and Sánchez-Tamés, R., Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1996, vol. 44, pp. 261–5. doi.org/10.1007/BF00048534.
 45. Fernández, H., Bertrand, A., and Sánchez-Tamés, R., Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes, *Sci. Hort.*, 1997, vol. 68, pp. 243–7. doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00986-7.
 46. Menéndez, V., Revilla, M.A., Fal, M.A., and Fernández, H., The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L., *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2009, vol. 96, pp. 245–50. doi.org/10.1007/s11240-008-9481-y.
 47. Greer, G.K., Dietrich M.A., DeVol J.A., and Rebert A., The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* Gametophytes, *Amer. Fern J.*, 2012, vol. 102, pp. 32–46. doi.org/10.1640/0002-8444-102.1.32.
 48. Bonomo, M.C., Martínez, O.G., Tanco, M.E., Cardozo, R., and Avilés, Z., Spores germination and gametophytes of *Alsophila odonelliana* (Cyatheaceae) in different sterile media, *Phyton (Buenos Aires)*, 2013, vol. 82, pp. 119–26.
 49. Spiro, M.D., Torabi, B., and Cornell, C.N., Cytokinin induce photomorphogenic development in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*, *Plant Cell Physiol.*, 2004, vol. 45, pp. 1252–60. doi.org/10.1093/pcp/pch146.
 50. Banks, J.A., Gametophyte development in ferns, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 50, pp. 163–86. doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.163.
 51. Parajuli, J., Joshi, S.D., In vitro study of effects of growth hormones on sporophyte development of *Cyathea spinulosa*, *Int. J. Biodivers. Conserv.*, 2014, vol. 6, pp. 247–55. doi.org/10.5897/IJBC2014.0684.
 52. Grichuk, V.P., Monoszon, M.H., The determinant of single-beam spores of the ferns from the family Polypodiaceae R. Br., growing on the territory of the USSR. Moscow: Nauka, 1971 (in Russian).
 53. Nayar, B.K., Kaur, S., Gametophytes of Homosporous Ferns, *Bot. Rev.*, 1971, vol. 37, pp. 295–396. doi.org/10.1007/BF02859157.
 54. Tryon, A.F., Lugardon B., Dryopteridaceae Herter, In *Spores of the Pteridophyta*, Springer, NY, 1991, pp. 416–501. doi.org/10.1007/978-1-4613-8991-0_25.
 55. Gaba, V., Plant growth regulators in plant tissue culture and development, In *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, ed. Trigiano, R.N. and Gray, D.J., CRC Press, 2005, pp. 87–99.

Надійшла в редакцію 26.04.18

Після доопрацювання 01.06.18

Прийнята до друку 18.05.19