

## Размножение папоротников посредством спор в культуре *in vitro* (обзор литературы)

© Л.А. Шелихан\*, Э.В. Некрасов

Амурский филиал Ботанического сада-института  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Благовещенск  
e-mail: \*solecito91@mail.ru

Интерес к папоротникам как объектам биотехнологии определяется особенностями их развития и репродукции, знание которых важно для понимания эволюции растений. Они являются ценными декоративными и медицинскими растениями, продуцентами биологически активных веществ. Воспроизводство редких и исчезающих видов папоротников важно для сохранения видового разнообразия растений. К настоящему времени накоплен обширный материал по культивированию папоротников в условиях *in vitro*. Разработанные методы открыли новые возможности для углубленного изучения, практического использования и сохранения видов этой группы растений. Обзор рассматривает вопросы размножения папоротников методами *in vitro* при использовании спор в качестве эксплантов. Протоколы, описанные в литературе, позволяют разработать оптимальные условия для введения в культуру *in vitro* и размножения новых видов.

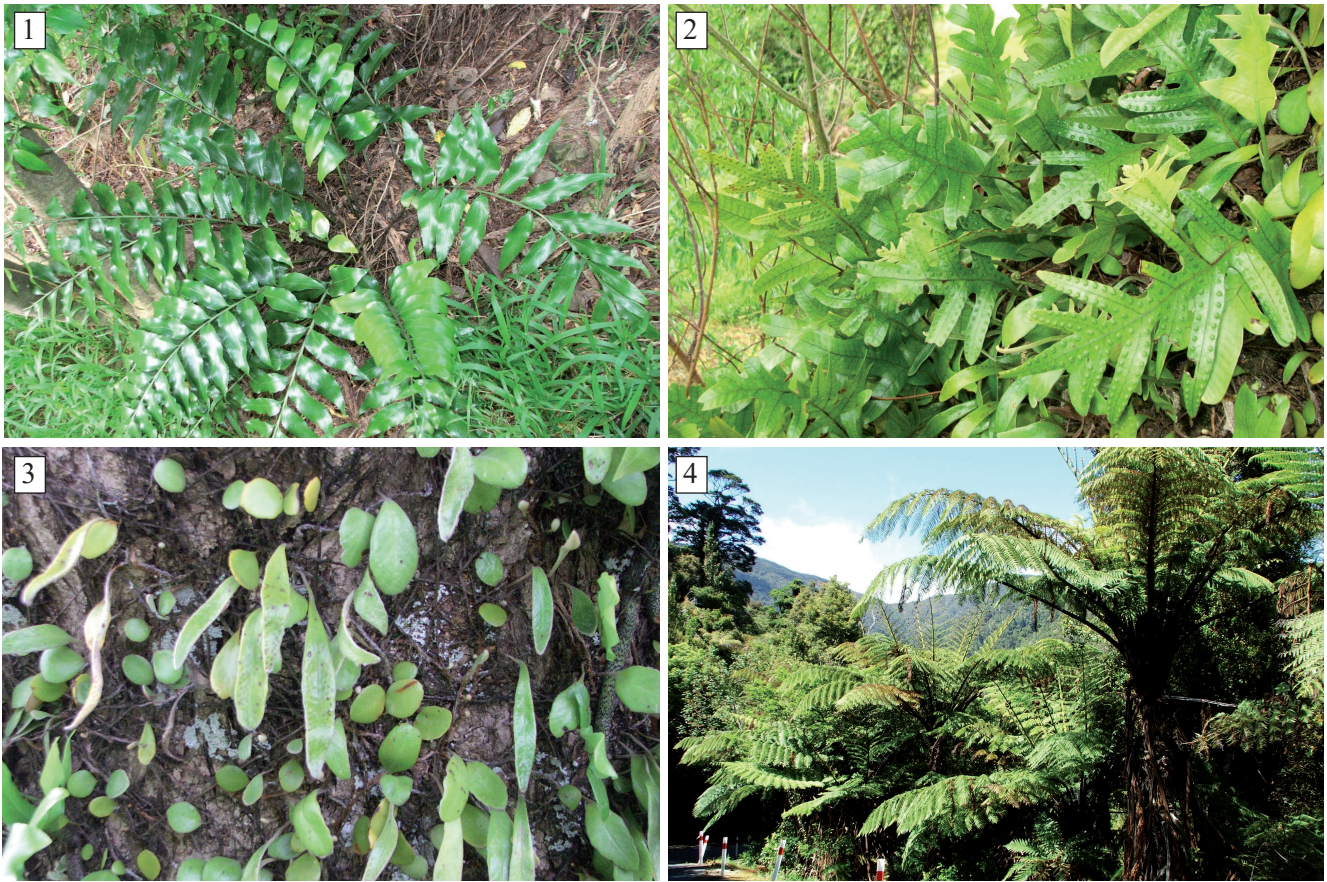
**Ключевые слова:** Polypodiophyta, папоротники, споры, гаметофит, спорофит, культура *in vitro*.

### 1. Папоротники как объекты биотехнологии

Папоротники являются споровыми сосудистыми растениями, чьи ископаемые остатки известны из девонского и каменноугольного периодов. Согласно последним классификациям, папоротники вместе с хвощами и псилоитовыми составляют группу монолофитов (monilophytes, Smith et al., 2008) или отдел Polypodiophyta (Christenhusz, Chase, 2014). По разным оценкам они включают от 9000 до 10500 видов (Smith et al., 2008; Christenhusz, Chase, 2014) и представлены наземными, эпифитными и водными растениями. Папоротники – преимущественно травянистые растения различных жизненных форм, хотя некоторые их группы или отдельные виды являются древовидными (Рис. 1). Они распространены от тропиков и умеренной зоны до Арктики, от дождевых лесов до альпийского горного пояса и аридных районов. Среди адаптивных преимуществ папоротников выделяют способность к фотосинтезу в условиях пониженной освещенности, высокую устойчивость к дисбалансу питательных веществ в субстрате и мощный арсенал вторичных метаболитов, определяющих устойчивость растений к фитопатогенам, вредителям и травоядным животным (Page, 2002). Эти свойства папоротников имеют большой потенциал для практического использования.

Благодаря способности извлекать, накапливать и обезвреживать токсичные вещества, папоротники рассматривают как средство для фиторемедиации окружающей среды (Dhir, 2018). Накоплены многочисленные сведения по биологической активности вторичных метаболитов из папоротников (Goswami et al., 2016; Baskaran et al., 2018). Многие виды издавна используют в пищу и народной медицине (von Aderkas, 1984; Crowe, 1997; Khrapko, 2007; Kreshchenok, 2008; Liu et al., 2012a; Maroyi, 2014). Папоротники могут быть источниками компонентов для парфюмерной промышленности (Froissard et al., 2011). Велика эстетическая ценность папоротников: их используют при создании и благоустройстве садов, ландшафтном дизайне и озеленении, в качестве комнатных растений и компонентов цветочных композиций, тем самым они вносят определенный вклад в точную индустрию (Singh, Johari, 2018).

Деградация и уничтожение местообитаний папоротников в результате изменения климата и деятельности человека ведет к сокращению численности и исчезновению их популяций, наносится невосполнимый ущерб биологическому разнообразию растений. Особенно уязвимы узколокальные эндемики и виды на границе ареала. В Красную книгу Российской Федерации (Trutnev et al., 2008) занесены 23 вида таких папоротников.



**Рисунок 1.** Жизненные формы папоротников: 1 – *Asplenium oblongifolium* с прямостоячим корневищем; 2 – *Phymatosorus pustulatus* с ползучим корневищем; 3 – эпифитный или скальный вид *Pyrrosia eleagnifolia* с ползучим корневищем; 4 – древовидные папоротники с одревесневающими стволами. Фото авторов.

**Figure 1.** Life forms of ferns: 1 – *Asplenium oblongifolium* with erect rhizome; 2 – *Phymatosorus pustulatus* with long-creeping rhizomes; 3 – epiphytic or rupestral *Pyrrosia eleagnifolia* with long-creeping rhizomes; 4 – tree ferns with woody trunks. Authors' photos.

Первые публикации по культивированию папоротников в условиях *in vitro* появились в середине 20 века (Wetmore, Morel, 1949; Dörr, 1950; Steeves, Sussex, 1952), хотя работы по проращиванию спор имеют историю, начиная с 18 века (Arnautova, 2008). Целью ранних исследований были особенности роста и развития протонем, полученных при проращивании спор (Miller, Miller, 1961, 1965; Ito, 1969; Weinberg, Voeller, 1969; Wada, Furuya, 1970). С тех пор культуры *in vitro* нашли применение в исследованиях не только развития папоротников (Li et al., 2013), но и семенных растений (Fang et al., 2017), а также различных аспектов генетики, молекулярной биологии и биотехнологии растений (Johari, Singh, 2018). Культуры тканей папоротников используют также для изучения механизмов устойчивости этих растений к тяжелым металлам (Yoshihara et al., 2005).

Несмотря на многочисленные данные о присутствии биологически активных соединений

в папоротниках (Goswami et al., 2016; Baskaran et al., 2018), работ по использованию их культур клеток для получения вторичных метаболитов немного (Svatos, Macek, 1994; Reixach et al., 1996, 1997; Basile et al., 1997). В культуру *in vitro* были введены различные виды, имеющие медицинское значение, а также съедобные папоротники (Singha et al., 2013a). Кроме того, были предприняты попытки выращивания *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* в культуре *in vitro* для получения ароматических соединений (Pinto et al., 2013; Castilho et al., 2018).

Наибольшее приложение методы размножения папоротников в условиях *in vitro* получили в декоративном садоводстве (Fernandez, Revilla, 2003). Только одна голландская фирма Vitro Plus ежегодно выращивает более 30 миллионов декоративных папоротников и поставляет их в 50 стран по всему миру (DutchGlory, 2018). Наконец, методы биотехнологии широко используются для

сохранения редких и исчезающих видов (Renner, Randi, 2004; Singha et al., 2013b; Pence, 2014; Shukla, Khare, 2014; Ballesteros, Pence, 2018). Было показано, что инкапсулированные и обработанные стерилизующим агентом споры и гаметофиты *Cyathea australis*, выращенные *in vitro*, сохраняют жизнеспособность при криоконсервации (Mikula et al., 2009), что открывает большие возможности для долгосрочного хранения редких видов.

Цель представленного обзора – обобщить литературные данные по введению и размножению папоротников в культуре *in vitro* при использовании спор в качестве эксплантов.

## 2. Особенности размножения папоротников и потенциальные экспланты для введения в культуру *in vitro*

Выбор эксплантов для введения в культуру *in vitro* зависит как от целей использования этой культуры, так и от потенциала выбранной части растения для дальнейшего успешного её развития. Жизненный цикл папоротников включает чередование поколений: морфологически сложного диплоидного бесполого спорофита и простого гаплоидного полового гаметофита (Hauffler et al., 2016; Johari, Singh, 2018). Гаметофит развивается непосредственно из спор и является самостоятельно живущим организмом, у которого образуются репродуктивные органы (археогонии и антеридии) и гаметы, происходит оплодотворение яйцеклетки. Спорофит развивается из зиготы и на начальных этапах связан с гаметофитом, от которого получает питание. Позже гаметофит отмирает, а спорофит переходит к самостоятельному существованию. В процессе роста и развития спорофита на его вайях формируются спорангии со спорогенной тканью, из которой в результате мейоза образуются споры. На основе морфологии спор папоротники делят на равноспоровые (гомоспоровые) и разноспоровые (гетероспоровые). Равноспоровые папоротники производят только один тип спор, из которых развиваются обоеполые гаметофиты, формирующие как женские, так и мужские половые органы, тогда как разноспоровые папоротники размножаются посредством мегаспор (женские споры) и микроспор (мужские споры), из которых прорастают гаметофиты, производящие только женские и мужские гаметы, соответственно (Johari, Singh, 2018). Из современных папоротников лишь водные из порядка *Salviniales* являются разноспоровыми (Smith et al., 2008). Подавляющее большинство современных папоротников являются равноспоровыми, однако и в этом случае существуют физиологические

механизмы, обеспечивающие обмен генетическим материалом только между разными гаметофитами (Hauffler et al., 2016; Rivera et al., 2018a).

Различные нарушения полового процесса, при которых развитие новых растений происходит без слияния гамет, объединяют под термином «апомиксис». Для папоротников апомиксис включает образование нередуцированных спор в результате нарушения мейоза или предшествующего ему митотического деления спороцитов (диплоспория), и образование спорофита из соматических клеток гаметофита (апогамия) (Foster, Gifford, 1974; Liu et al., 2012b). С другой стороны, у папоротников возможно образование гаметофита непосредственно из ткани спорофита без предшествующих этому мейоза и споруляции (апоспория) (Martin et al., 2006). Эти способы неполового размножения нашли применение в биотехнологии (Fernandez, Revilla, 2003; Martin et al., 2006; Johari, Singh, 2018).

Споры папоротников являются удобным объектом для получения культуры *in vitro*. Естественно, для размножения разноспоровых папоротников в условиях *in vitro* необходимо использовать как микро-, так и мегаспоры. Для размножения равноспоровых папоротников важно учитывать возможную физиологическую разноспоровость, которая может существенно варьировать между видами одного рода, так и внутри вида (Hauffler et al., 2016), и использовать споры от разных родительских растений для успешного полового процесса.

Поскольку гаметофит является свободноживущим организмом, имеет краевую меристему, содержащую цепь одиночных клеток, которые при определенных условиях могут делиться, приводить к регенерации и созданию новых гаметофитов, папоротники возможно клонировать также на этой стадии (Rybczynski et al., 2018). В естественных условиях гаметофиты тоже могут размножаться вегетативно (Arnautova, 2008). В частности, некоторые виды папоротников образуют геммы, которые отделяются от материнского растения и образуют новые гаметофиты (Raghavan, 1989). Размножение гаметофита *in vitro* может протекать по вегетативному пути (Fernandez, Revilla, 2003), а также в результате каллусогенеза (Joyce et al., 2014). Различные части гаметофита могут различаться по способности образовывать клоны и по жизнеспособности в культуре (Johari, Singh, 2018).

Хорошо известна способность спорофитов папоротников к вегетативному размножению. Это могут быть почки на корневищах, различного рода выводковые почки на поверхности вай и черешков, столоны, клубни, адвентивные почки на стеблях, корневые и листовые геммы

(Johns, Edwards, 1991). Вегетативное размножение спорофитов в условиях *in vitro* позволяет получать растения идентичные материнскому. Для этого в качестве эксплантов используют изолированные фрагменты органов растения, например, части корневища (Higuchi, Amaki, 1989; Thakur et al., 1998; Hedge et al., 2006) или фрагменты стебля и вай папоротника (Hicks, von Aderkas, 1986; Camloh, Ambrozic-Dolinsek, 2010), столоны, выводковые почки и т.д. (Rybczynski et al., 2018). Работы по использованию вегетативных частей спорофитов в качестве эксплантов для культивирования *in vitro* в этом обзоре подробно не рассматриваются. С ними можно ознакомиться в обзорах (Singha et al., 2013a, Rybczynski et al., 2018) и приведенных выше ссылках.

### 3. Размножение папоротников в культуре *in vitro*

Размножение папоротников *in vitro* включает несколько этапов, которые зависят от типа экспланта, связаны с фазами развития растения и, в свою очередь, определяют набор оптимальных компонентов питательных сред, необходимость включения регуляторов роста и условия выращивания. Для размножения посредством спор значимыми этапами являются: инициация прорастания спор, рост и размножение гаметофитов, экспрессия половых органов, оплодотворение, рост и дифференциация спорофитов, укоренение и акклиматизация новых растений (Haddad, Bayerly, 2014; Johari, Singh, 2018).

Кроме папоротников, культивирование *in vitro* известно и для других споровых растений. Для хвощей такие исследования описаны в работах (Kuriyama et al., 1989; Kuriyama et al., 1992; Guillon, Raquin, 2002).

#### 3.1. Введение в культуру *in vitro*

Для получения спор спороносные вайи папоротников собирают в период зрелости. На всхожесть спор могут влиять температура окружающей среды, когда споры были собраны, и степень оводненности спор (Parajuli, Joshi, 2014). Вайи предварительно просушивают для высвобождения спор при 20°C (Makowski et al., 2016; Babenko et al., 2018) или 30°C (Renner, Randi, 2004), при необходимости используют иглу для их высвобождения или метод фильтрации (Renner, Randi, 2004). Однако для лучшего отделения спор и спорангиев от растительного материала, их просеивают через тонкую сетчатую ткань или сито (Jang et al., 2017; Rivera et al., 2018b). Очищенный материал либо сразу применяют в экспериментах, либо оставля-

ют на хранение, например, при 4°C (Chang et al., 2007; Jang et al., 2017; Rivera et al., 2018b).

Хранение спор негативно сказывается на их дальнейшем развитии в культуре *in vitro*. По данным Л.М. Бабенко и соавторов (Babenko et al., 2018) прорастание свежесобраных спор *Polystichum aculeatum* составило 80–95% и этот показатель снижался до 20% при хранении при 20°C в течение 1,5–2 лет. Хранение спор *Platyserium bifurcatum* в течение 14 мес. в большей степени снижало прорастание стерилизованных спор, чем необработанных (Camloh, 1999). Тем не менее, известны случаи успешного введения в культуру *in vitro* спор из гербарных образцов после предварительной дезинфекции путем промораживания при –18°C и хранения в неконтролируемых условиях с ежегодной фумигацией (Moura et al., 2015). При этом всхожесть 6-летних спор *Anogramma leptophylla* и 8-летних *Cheilanthes acrostica* и *Cosentinia vellea* была ниже 50% (Moura et al., 2015). Споры *Ceratopteris richardii*, напротив, нуждались в хранении несколько месяцев, чтобы достигнуть максимальной всхожести (Warne, Hickok, 1987).

Для поверхностной стерилизации спор используют различные стерилизующие агенты (Табл. 1), среди которых наиболее популярным является гипохлорит натрия (NaClO) и коммерческие отбеливатели на его основе. Добавление в качестве эмульгатора детергентов (Твин-20, Твин-80 или Типол) к стерилизующему агенту способствует лучшему смачиванию поверхности спор и, следовательно, повышает эффективность процесса (Табл. 1). Иногда перед стерилизацией споры замачивают в воде или растворе детергента (например, 0,1 г/л Твин-20) от 30 мин до 24 ч (Fernandez et al., 1997a; Wu et al., 2010; Jang et al., 2017; Castilho et al., 2018; Rivera et al., 2018b). В качестве других стерилизующих агентов для спор применяют гипохлорит кальция (Ca(ClO)<sub>2</sub>) и перекись водорода (Табл. 1). Иногда применяют двухступенчатую стерилизацию, при которой на первом этапе споры обрабатывают 70–80% этиловым спиртом (Табл. 1). В качестве третьего этапа могут добавлять раствор фунгицида (Pinto et al., 2013). После стерилизации материал промывают несколько раз стерильной водой для удаления стерилизующего агента. Для стерилизации и последующей промывки споры помещают в фильтровальные пакетики или суспендируют их в стерилизующем растворе с последующим центрифугированием (Fernandez, Revilla, 2003; Makowski et al., 2016; Babenko et al., 2018). Посев спор на питательную среду осуществляют путем переноса определенного объема суспензии спор на питательную среду

**Таблица 1.** Стерилизующие агенты, рекомендуемые для поверхностной стерилизации спор папоротников  
**Table 1.** Sterilizing agents recommended for surface sterilization of fern spores

Вид Species	Стерилизующий агент / комбинация агентов Sterilizing agent / combination of agents	Время обработки, мин Time of treatment, min	Литература References
<i>Adiantum capillus-veneris</i> , <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> , <i>Ceterach officinarum</i> , <i>Davallia canariensis</i> , <i>Dryopteris dilatata</i> , <i>D. filix-mas</i> , <i>Dicksonia antarctica</i> , <i>Polypodium cambricum</i>	0,5% гипохлорит натрия + 0,1% Твин 20 (0.5% sodium hypochlorite + 0.1% Tween 20)	10	Somer et al., 2010
<i>Anemia tomentosa</i> var. <i>anthriscifolia</i>	1% гипохлорит натрия + Твин 20 (1% sodium hypochlorite + Tween 20)	10	Castilho et al., 2018
<i>Asplenium nidus</i>	0,5% гипохлорит натрия + 0,1% Твин 20 (0.5% sodium hypochlorite + 0.1% Tween 20)	10	Fernandez et al., 1993
<i>A. nidus</i>	1) 70% этиловый спирт (70% ethanol) 2) Кlorокс (5,25% гипохлорит натрия) + Твин 20 (Clorox (5.25% sodium hypochlorite) + Tween 20)	0,17 15	Haddad, Bayerly, 2014
<i>Dryopteris affinis</i>	6% гипохлорит кальция (6% calcium hypochlorite)	5	Soare et al., 2010
<i>Osmunda regalis</i>	2% перекись водорода (2% hydrogen peroxide)	20	Makowski et al., 2016
<i>Rumohra adiantiformis</i>	1) 70% этиловый спирт (70% ethanol) 2) 0,1 % гипохлорит натрия + Твин 20 (0.1% sodium hypochlorite + Tween 20)	0,5 10	Avila-Perez et al., 2011

(Castilho et al., 2018), промоканием питательной среды фильтровальной бумагой со спорами (Makowski et al., 2016), либо с помощью микробиологической петли и других инструментов.

Большое значение имеет состав компонентов питательных сред для культивирования, поскольку такие среды обеспечивают новые растения необходимыми веществами для нормального роста. Состав питательных сред варьирует в зависимости от вида культивируемых растительных объектов и этапов размножения. Все питательные среды предварительно стерилизуют путем автоклавирования для предотвращения заражения микроорганизмами. В качестве питательных сред используют прописи Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Кнопа (Кноп, 1865), Дайера (Dyer, 1979), Клековского (СК) (Klekowski, 1969), Мейера (Meyer et al., 1955), Кнудсона (Knudson, 1946) и Нича (Nitsch, Nitsch, 1969). Применяют как оригинальные прописи, так и их модификации, и дополнения к ним, в зависимости от этапа размножения (Табл. 2). Чаще всего в литературных источниках упоминается питательная среда МС и ее вариации, которые обычно заключаются в пропорциональном уменьшении содержания макроэлементов (1/2, 1/4 и т.д.) по сравнению с исходной прописью.

Споры содержат все питательные вещества, необходимые для раннего развития гаметофита, поэтому, по мнению Menendez и соавторов (2010), использование низкопитательной среды на на-

чальных стадиях прорастания, таких как среда Кнудсона или разведенная среда МС, может быть оправдано. Так, наибольшее прорастание спор *Drynaria fortunei* наблюдали при содержании солей МС в 4 раза меньше (1/4МС) исходной прописи (1МС), однако гаметофиты на такой среде развивались медленнее по сравнению с 1/2МС. Среды на основе 1МС и 2МС подавляли как прорастание спор, так и дальнейшее развитие гаметофитов (Chang et al., 2007). По другим данным (Jang et al., 2017), прорастание спор не зависит от состава и концентрации солей в среде, однако эти параметры влияют на дальнейшее развитие гаметофитов.

Прорастание спор возможно в отсутствие углеводов в питательной среде (Raghavan, 1989), однако добавление сахарозы способствовало увеличению доли проросших спор (Sheffield et al., 2001). Напротив, концентрация сахарозы выше определенного уровня (1,5–2%) существенно снижала прорастание (Chang et al., 2007; Wu et al., 2010). Присутствие 1–5% сахарозы в питательной среде также уменьшало долю проросших спор в работе (Renner, Randi, 2004). Более того, эффект сахарозы зависел от концентрации солей в питательной среде: при пониженной концентрации солей (1/4МС) сахароза стимулировала прорастание, тогда как при более высоких концентрациях (1/2МС, 1МС) эффект отсутствовал (Wu et al., 2010). По сравнению с другими углеводами (мальтоза, глюкоза, фруктоза) сахароза была наиболее эффективна (Chang et al., 2007).

Таблица 2. Культуральные среды и условия культивирования для папоротников

Table 2. Culture media and cultivation conditions for ferns

Вид Species	Среда для прорастания спор Medium for spore germination	Среда для развития гаметофитов Medium for gametophyte development	Среда для образования спорофитов Medium for sporophyte formation	Среда для укоренения спорофитов Medium for rooting of sporophytes	pH	Фото-период, ч Photo-period, h	T, °C	Литература References
<i>Adiantum capillus-veneris</i> , <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> , <i>Ceterach officinarum</i> , <i>Davallia canariensis</i> , <i>Dryopteris dilatata</i> , <i>D. filix-mas</i> , <i>Dicksonia antarctica</i> , <i>Polypodium cambricum</i>	MC + 2% сахара + 0,7% агар (MS + 2% sucrose + 0.7% agar)	MC + 2% сахара + 0,7% агар (MS + 2% sucrose + 0.7% agar)	MC + 2% сахара + 0,7% агар + 1 мг/л БАП (MS + 2% sucrose + 0.7% agar + 1 mg/l BAP)	–	5,7	16	25	Somer et al., 2010
<i>Asplenium nidus</i>	MC + 3% сахара + 0,7% агар (MS + 3% sucrose + 0.7% agar)	MC + 3% сахара + 0,7% агар (MS + 3% sucrose + 0.7% agar)	MC + 3% сахара + 0,7% агар (MS + 3% sucrose + 0.7% agar)	–	–	16	25	Fernandez et al., 1993
<i>A. nidus</i>	MC + 3% сахара + 0,5% агар, в темноте, 22±2°C (MS + 3% sucrose + 0.5% agar, in dark, 22±2°C)	MC + 3% сахара + 0,3% агар + 3 мг/л Кин + 0,1 мг/л НУК (MS + 3% sucrose + 0.3% agar + 3 mg/l Kin + 0.1 mg/l NAA)	1/2MC + 3% сахара + 0,5% агар + 255 мг/л фосфат натрия + 100 мг/л инозит + 0,4 мг/л тиамин + 2 мг/л БАП + 0,1–0,3 мг/л ИМК (1/2MS + 3% sucrose + 0.5% agar + 255 mg/l sodium phosphate + 100 mg/l inositol + 0.4 mg/l thiamine + 2 mg/l BAP + 0.1–0.3 mg/l IBA)	1/2MC + 2% сахара + 0,3% агар + 1 мг/л НУК (1/2MS + 2% sucrose + 0.3% agar + 1 mg/l NAA)	5,7	16	24 ± 2	Haddad, Bayerly, 2014
<i>Anemia tomentosa</i> var. <i>anthriscifolia</i>	1/2MC + 3% сахара + 0,8% агар (1/2MS + 3% sucrose + 0.8% agar)	1/2MC + 3% сахара + 0,8% агар (1/2MS + 3% sucrose + 0.8% agar)	1/2MC + 0,02 мг/л ЖК (1/2MS + 0.02 mg/l JA)	–	5,8	16	25 ± 1	Castilho et al., 2018
<i>Dryopteris affinis</i> , зеленые сорусы (green sori)	1/2MC без PP (1/2MS PGRs-free)	1/2MC без PP (1/2MS PGRs-free)	1/2MC без PP (1/2MS PGRs-free)	–	5,6	16	25 ± 1	Soare et al., 2010
<i>Osmunda regalis</i>	1/2MC + 2% сахара + 0,8% агар (1/2MS + 2% sucrose + 0.8% agar)	1/2 или 1/4MC + 2% сахара, без нитрата аммония и витаминов (1/2 or 1/4MS + 2% sucrose, ammonium nitrate- and vitamin-free)	1/8MC + 2% сахара, без нитрата аммония и витаминов (1/8MS + 2% sucrose, ammonium nitrate- and vitamin-free)	–	5,8	16	21 ± 1	Makowski et al., 2016
<i>Rumohra adiantiformis</i>	Кноп + 0,5% агар + 0,1% АУ (Кноп + 0.5% agar + 0.1% AC)	Кноп + 0,5% агар + 0,1% АУ + 0,5 мг/л БАП (Кноп + 0.5% agar + 0.1% AC + 0.5 mg/l BAP)	Кноп + 0,5% агар + 0,1% АУ (Кноп + 0.5% agar + 0.1% AC)	1/2MC + 3% сахара + 0,8% агар + 0,1% АУ + 0,01 мг/л НУК (1/2MS + 3% sucrose + 0.5% agar + 0.1% AC + 0.01 mg/l NAA)	5,0	16	25 ± 1	Avila-Perez et al., 2011

Примечание: Прочерк «–» означает отсутствие информации. MC – среда Мурасиге–Скуга; БАП – бензиламинопурин; ИМК – индолилмасляная кислота; PP – регуляторы роста; ЖК – жасмониевая кислота; НУК – нафтилуксусная кислота; АУ – активированный уголь.

Notes: Dash «–» means no information available. MS – culture medium Murashige–Skoog; BAP – benzylaminopurine; IBA – indolylbutyric acid; PGRs – plant growth regulators; JA – jasmonic acid; NAA – naphthylacetic acid; AC – activated charcoal.

Прорастание спор находится под контролем различных факторов окружающей среды, включая температуру, освещение, pH среды, газовый состав и различные химические соединения (Raghavan, 1989; Suo et al., 2015). Хотя эти эффекты зачастую бывают видоспецифичными, существуют общие требования, имеющие отношение к культивированию папоротников *in vitro*. Для оптимального прорастания необходима температура 20–25°C (Raghavan, 1989; Suo et al., 2015), хотя для спор *Ophioglossum engelmanni* необходима стратификация с чередованием теплых и холодных условий (Raghavan, 1989). Большинство папоротников нуждаются в освещении для прорастания спор, причем на прорастание влияют продолжительность, интенсивность и спектральный состав освещения. Как правило, папоротники, имеющие фотосинтезирующие гаметофиты, нуждаются в интенсивном, продолжительном освещении для прорастания спор и не прорастают в темноте (Raghavan, 1989; Chang et al., 2007; Wu et al., 2010; Suo et al., 2015). Для многих видов свет в красной области является оптимальным, тогда как дальний красный и синий подавляют прорастание спор (Raghavan, 1989; Chang et al., 2007; Suo et al., 2015). Влияние параметров освещения на прорастание спор может варьировать даже для одного вида в зависимости от освещения во время образования спор, места и времени сбора спор и условий их хранения (Raghavan, 1989). На молекулярном уровне эффекты освещения зависят от фоторецепторов (фитохром и криптохром), присутствующих в спорах, под контролем которых находится первый клеточный митоз споры (Suo et al., 2015).

Для большинства видов оптимальные значения pH среды для прорастания спор находятся в слабокислой и нейтральной областях (Табл. 2), однако для некоторых видов нужны более кислые или щелочные условия в соответствии с кислотностью почв, на которых растения произрастают в естественных условиях (Raghavan, 1989; Chang et al., 2007; Suo et al., 2015).

Обычно споры проращивают в условиях *in vitro* без добавления регуляторов роста (Табл. 2). По-видимому, собственных эндогенных гормонов для этого достаточно (Pinto et al., 2013). Тем не менее известно, что регуляторы роста оказывают влияние на прорастание спор. Гиббереллиновая кислота (ГКЗ) способна обращать ингибирующее действие темноты у некоторых видов и вызывать прорастание спор (Raghavan, 1989; Suo et al., 2015). Аналогичным действием обладает гиббереллиноподобный гормон, названный антеридиогеном, способный вызывать образование

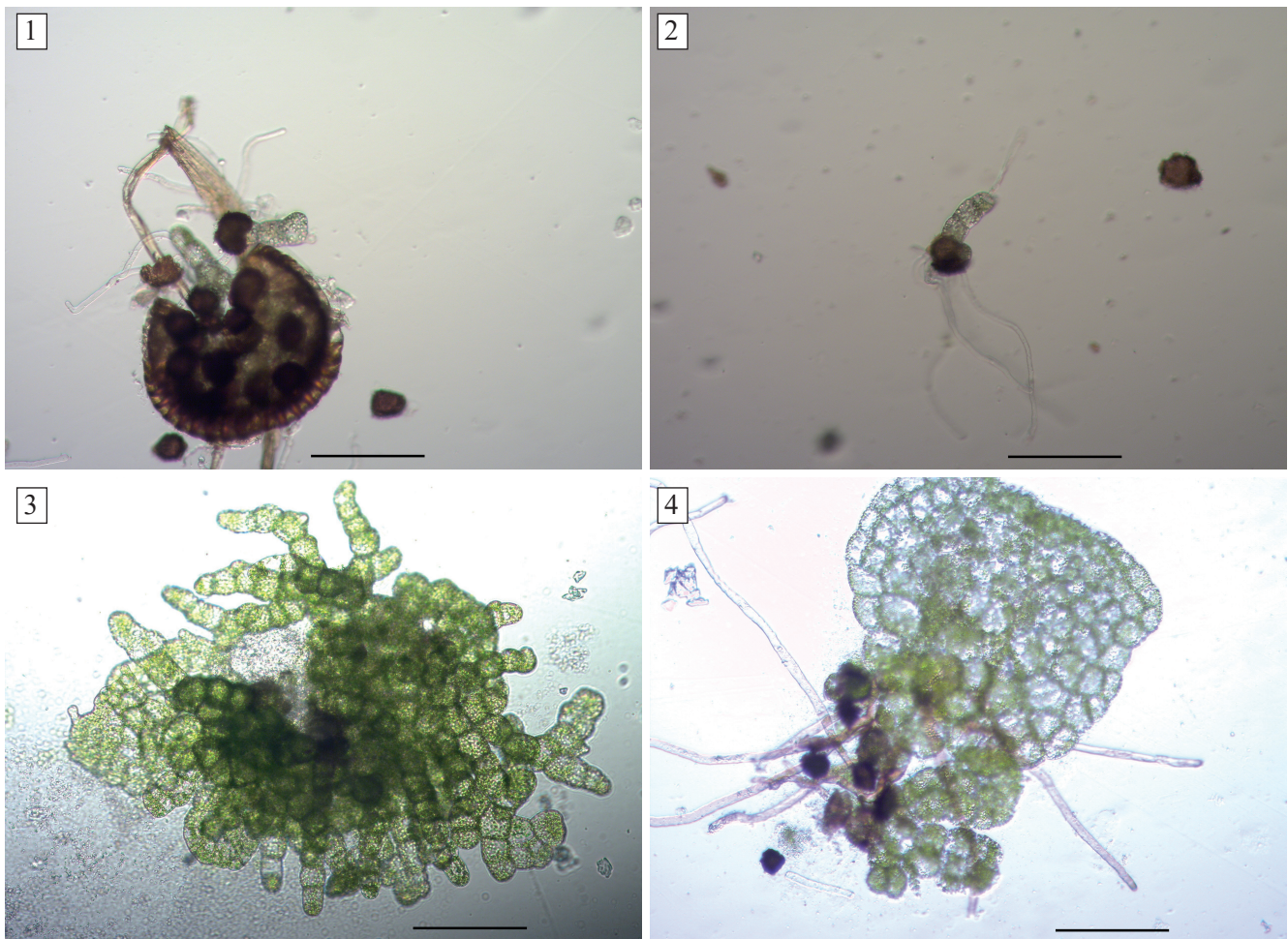
антеридиев на поверхности гаметофитов и выделенный из многих папоротников (Suo et al., 2015). С другой стороны, ГКЗ ингибировала прорастание спор *Polystichum aculeatum* в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М на 35–60% (Babenko et al., 2018). В этой же работе было показано, что цитокинин бензиламинопуридин (БАП) ингибирует прорастание спор только при концентрации  $10^{-5}$  М и не влияет при более низких концентрациях. Ауксин индолилуксусная кислота (ИУК) существенно снижал прорастание спор *Dipteris wallichii* (Singha et al., 2013b).

Среди других факторов, способных влиять на прорастание спор в условиях *in vitro*, называют плотность спор на поверхности среды. Как слишком высокая, так и слишком низкая плотность спор отрицательно сказываются на скорости прорастания, хотя имеющиеся данные по оптимальной плотности спор находятся в очень большом диапазоне (Suo et al., 2015). Добавление жидкой воды на поверхность питательной среды может способствовать прорастанию спор (Fernandez et al., 1999). Споры возможно проращивать на жидкой среде как в отсутствие сахарозы (Marimuthu, Manickam, 2011), так и с добавлением 2% сахарозы (Simoes-Costa et al., 2015).

### 3.2. Развитие и размножение гаметофитов

На Рис. 2 показаны некоторые этапы развития гаметофитов. По данным разных авторов появление гаметофитов при прорастании спор на питательной среде происходит в течение 1–4 недель (Fernandez et al., 1993; Chang et al., 2007; Khan et al., 2008; Mikula et al., 2009; Soare et al., 2010; Simoes-Costa et al., 2015; de Vargas, Droste, 2014; Moura et al., 2015; Babenko et al., 2018; Castilho et al., 2018). Прорастание спор *Adiantum capillus-veneris* наблюдали через 3–5 дней (Maridass et al., 2010). Споры *Pronophrum triphyllum* начали прорастать через 3–4 недели, а *Sphaerostephanos unitus* – через 35 дней (Marimuthu, Manickam, 2011). Для различных древовидных папоротников время прорастания спор составило от 4 до 16 недель (Goller, Rybczynski, 2007).

Для массового получения папоротников гаметофит, выращенный из спор, можно использовать непосредственно, т.е. в результате образования гамет и сингамии получать спорофиты. Перед экспрессией половых органов гаметофит можно предварительно мультиплицировать, увеличивая копии потенциальных продуцентов спорофитов. Наконец, в результате апогамии спорофиты могут быть индуцированы из ткани гаметофита без оплодотворения.



**Рисунок 2.** Развитие гаметофитов *Polystichum craspedosorum* и *Matteuccia struthiopteris* в культуре *in vitro*: 1 – спорангий и прорастающие споры *P. craspedosorum*; 2 – рост нитчатого гаметофита *P. craspedosorum*; 3 – конгломерат разветвленных проталлиев *P. craspedosorum*; 4 – формирование лопатовидного гаметофита *M. struthiopteris*. Шкала 200 мкм. Фото авторов.

**Figure 2.** Gametophyte development of *Polystichum craspedosorum* and *Matteuccia struthiopteris* in *in vitro* culture: 1 – a sporangium and germinated spores of *P. craspedosorum*; 2 – growth of a filamentous gametophyte of *P. craspedosorum*; 3 – an aggregate of branched protallia of *P. craspedosorum*; 4 – formation of a spatulated gametophyte of *M. struthiopteris*. Scale 200  $\mu\text{m}$ . Authors' photos.

Размножение гаметофитов требует более высоких концентраций солей по сравнению с прорастающими спорами, хотя часто используют тот же состав среды, что и для прорастания спор (Табл. 2). Вместе с тем, среды, обогащенные макроэлементами, например, МС, задерживают развитие архегониев и антеридиев. Напротив, более бедные по составу и/или концентрации солей среды (например, СК) задерживают пролиферацию гаметофитов, но способствуют образованию антеридий (Fernandez et al., 1997a). Очень высокие концентрации макроэлементов в среде Кнопа вызывали быстрый рост проталлия *Dryopteris nipponensis* по сравнению со средой МС и ее разбавленными вариантами (Jang et al., 2017). Повышенное содержание солей МС в питательной среде (1МС) нарушало развитие гаметофитов *Adiantum reniforme* var. *sinense*, тогда как

их снижение (1/4МС) было более благоприятным для развития гаметофитов в нормальный сердцевидный заросток. Тем не менее, полная среда МС способствовала развитию репродуктивных органов, особенно архегониев, а добавление сахарозы до 3% еще более усиливало их развитие (Wu et al., 2010). Не было различий по степени пролиферации гаметофитов *Osmunda regalis* между различными разведениями среды МС (1/2, 1/4 или 1/8МС) и средой Кнопа (Makowski et al., 2016).

Присутствие азота в нитратной и аммонийной форме оказывало положительный эффект на развитие гаметофитов *D. nipponensis* по сравнению с присутствием только одной формы (Jang et al., 2017). Аммонийный азот, напротив, задерживал рост проталлия *Osmunda japonica*, так что азот в форме нитрата был предпочтительным (Shin, Lee,

2009). Исключение нитрата аммония и витаминов из сред на основе МС увеличивало число гаметофитов *O. regalis* и их пролиферацию (Makowski et al., 2016). Добавление дигидрофосфата натрия ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) в питательную среду оказывает видоспецифичное влияние на гаметофит. Например, кластеры гаметофитов *Anogramma leptophylla* и *Cosentinia vellea* увеличивались в диаметре в присутствии фосфата, тогда как для гаметофитов *Cheilanthes acrostica* такого эффекта не было (Moura et al., 2015).

Включение сахарозы в состав питательной среды в невысоких концентрациях (1–3%) обычно усиливает рост гаметофитов (Renner, Randi, 2004; Menendez et al., 2010; Jang et al., 2017). Присутствие сахарозы задерживало развитие репродуктивных органов у гаметофита *Cyathea lepifera* (Kuriyama et al., 2004). Сахароза имела слабый стимулирующий эффект на рост гаметофитов или он отсутствовал у трех видов папоротников (*Anogramma leptophylla*, *Cosentinia vellea*, *Cheilanthes acrostica*), хотя низкие концентрации сахарозы (0,5–1%) сопровождалась увеличением числа спорофитов (Moura et al., 2015). Гаметофиты *Drynaria fortunei* на среде с сахарозой проходили стадии развития быстрее, чем в присутствии мальтозы и, особенно, глюкозы (Chang et al., 2007). В отсутствии минеральных солей сахароза была токсичной для гаметофитов, вызывая их некроз (Fernandez et al., 1999).

Значение pH среды оказывало влияние на количество архегониев на гаметофите *Drynaria fortunei*: их было больше при pH 7,7, чем при 6,7 и сильно снижалось как при кислых, так и щелочных значениях (Chang et al., 2007). Спектральный состав света влиял как на форму и размеры гаметофита, так и развитие половых органов *D. fortunei*: если синий (450 нм) и белый (380–780 нм) свет вызывали образование нормальной сердцевидной формы гаметофитов, то красный (660 нм) и дальний красный (735 нм) способствовали росту удлинённых гаметофитов. Синий цвет способствовал образованию архегониев, красный – антеридиев, белый – как архегониев, так и обоеполюх гаметофитов, тогда как дальний красный подавлял образование половых органов (Chang et al., 2007).

Регуляторы роста оказывают влияние как на рост и развитие таллома гаметофитов, так и на образование репродуктивных органов и последующее формирование спорофитов. Цитокинин БАП в концентрации 4,4 мкМ задерживал нормальное развитие гаметофита *Blechnum spicant* (Menendez et al., 2009). БАП в концентрациях  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  М нарушал развитие протонемы *Polystichum aculeatum*, вызывая разной степени разветвления и хаотич-

ное разрастание проталлия в зависимости от концентрации цитокинина. При более низких концентрациях БАП ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  М) нормальное развитие гаметофита восстанавливалось после 1,5 мес. культивирования (Vabenko et al., 2018). Сочетание БАП и ауксина нафтилуксусной кислоты (НУК) в концентрациях 1–4 мг/л и 0,1–0,5 мг/л, соответственно, стимулировали размножение гаметофитов *Asplenium nidus*. При этом оптимальные концентрации составляли 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК, а более высокие вызывали побурение ткани (Khan et al., 2008). Включение БАП и НУК в питательную среду в таких же концентрациях задерживало рост и развитие гаметофитов четырех видов папоротников (*Cyathea australis*, *C. cooperi*, *C. cunninghamii* и *Dicksonia antarctica*) (Moura et al., 2012). ИУК усиливал рост гаметофитов *Dipteris wallichii* в концентрации 0,15 мг/л, дальнейшее увеличение концентрации ауксина вело к снижению роста (Singha et al., 2013b). Действие цитокинина кинетина (Кин) на половую дифференциацию гаметофита *Osmunda regalis* зависело от концентрации: низкие концентрации увеличивали долю женских гаметофитов, а высокие – уменьшали долю женских и увеличивали мужских и бесполох гаметофитов (Greer et al., 2012). Кинетин в сочетании с НУК вызывал увеличение размеров гаметофита при оптимальном соотношении Кин 3,0 мг/л и НУК 0,1 мг/л (Haddad, Bayerly, 2014). БАП в низких концентрациях (0,3 и 3 мкМ) способствовал образованию антеридий у *Blechnum spicant* (Fernandez et al., 1997a). Более высокие концентрации БАП (4,4 мкМ) сильно снижали образование архегониев по сравнению с контролем у этого же папоротника (Menendez et al., 2009). Жасмониновая кислота (ЖК) в концентрациях до 1 мкМ вызывала рост ризоидов, деление клеток и переход к планарной стадии у гаметофитов *Platycerium bifurcatum* (Camloh et al., 1996). ЖК стимулировала образование спорофитов на гаметофитах *Anemia tomentosa*, а ИУК, напротив, подавляла этот процесс (Castilho et al., 2018).

Гиббереллинам и гиббереллиноподобным веществам, к которым относится и антеридиоген, принадлежит ключевая роль в формировании полового полиморфизма у папоротников (Atallah, Banks, 2015). В большинстве случаев гиббереллины вызывают образование антеридий и задерживают образование архегоний. ГКЗ в составе питательной среды не влияла на образование протонемы *Polystichum aculeatum*, однако вызывала различные деформации таллома, а репродуктивные органы не образовывались вовсе (Vabenko et al., 2018).

Для развития гаметофитов и последующего образования спорофитов необходимо учитывать

физическое состояние среды и наличие свободной воды. Например, сухой вес гаметофитов *Osmunda regalis*, культивируемых на среде с 0,35% агаром увеличивался по сравнению с более твердой средой, содержащей 0,7% агара (Fernandez et al., 1997b), а у *Blechnum spicant* жидкая среда была благоприятна для роста гаметофитов, но гаметофиты при этом были гипергидратированы (Fernandez et al., 1997a). Присутствие капельной воды необходимо для перемещения мужских гамет и, в целом, периодическое добавление воды полезно для культуры папоротников (Menendez et al., 2010).

Плотность гаметофитов на питательной среде влияет на рост и половую экспрессию. В популяциях с низкой плотностью гаметофиты обычно бывают женскими или обоеполыми, крупными по размеру, в популяциях с высокой плотностью встречаются небольшие, лопатовидные и бесполое. Возможно это связано с конкуренцией за питательные вещества или наличием аллелопатических веществ. Видимо, необходимо сеять споры более разрозненно, что привело бы к последующему развитию гаметофитов обоих полов и успешному производству спорофитов (Menendez et al., 2010).

Механическая гомогенизация гаметофитов, выращенных в условиях *in vitro*, является методом массового получения как гаметофитов, так и спорофитов, особенно для папоротников с коротким жизненным циклом (Fernandez et al., 1999; Somer et al., 2010). Гаметофиты фрагментируют блендером в течение короткого времени в асептических условиях. Первоначально экспланты могут становиться бурными и омертвевшими, но постепенно некоторые клетки начинают делиться и образовывать новые гаметофиты и спорофиты (Fernandez et al., 1993). Гомогенизированные гаметофиты лучше регенирируют при культивировании в жидкой среде, вероятно из-за лучшего поглощения питательных веществ. Регуляторы роста в питательную среду для культивирования гомогенатов гаметофитов не добавляли (Fernandez et al., 1999; Somer et al., 2010). Полученные культуры успешно регенирировали новые гаметофиты, но воспроизводство новых спорофитов было скорее видоспецифичным. Так, некоторые виды (*Woodwardia virginica*, *Davallia canariensis*) образовывали спорофиты после гомогенизации гаметофитов, у других (*Asplenium nidus*, *Osmunda regalis*) образование спорофитов не наблюдали (Fernandez et al., 1993; Fernandez et al., 1999; Somer et al., 2010).

Размножение папоротников *in vitro* может ограничиваться на стадии гаметофита (Chang et al., 2007; Wu et al., 2010; Kodum et al., 2016; Jang et al., 2017). Так, 5-ти месячные гаметофиты *Drynaria fortunei*,

размноженные в условиях *in vitro*, помещали на почвенную смесь и через 14 недель в тепличных условиях развивались молодые спорофиты (Chang et al., 2007). Также гаметофиты *Adiantum reniforme* var. *sinense*, перенесенные на песчано-почвенный субстрат, успешно развивали спорофиты (Wu et al., 2010). Более сложная процедура адаптации гаметофитов и получения спорофитов *Pteridium esculentum* описана в работе (Kodum et al., 2016). Гаметофиты *Cyathea australis*, полученные в условиях *in vitro* и перенесенные на субстрат (торф – перлит, 1:1), существенно не отличались или даже уступали по развитию спорофитов различным вариантам культивирования *in vitro* (Moura et al., 2012). Тогда как в случае *Woodwardia fimbriata* наилучшие результаты по образованию спорофитов гаметофитами были получены именно на смеси торфа и перлита по сравнению с культивированием гаметофитов *in vitro* (Simoës-Costa et al., 2015).

Рост гаметофита обычно прекращается при развитии спорофита. Однако для разных видов в культуре *in vitro* наблюдали как прекращение роста гаметофитов, так и продолжение роста одновременно с ростом спорофита или даже после того, как спорофит сформировался (Fernandez et al., 1999).

### 3.3. Развитие и размножение спорофитов

Первые спорофиты, полученные от гаметофитов, появлялись в культуре на 4–5 неделе (Castillo et al., 2018), через 3 месяца от начала эксперимента (Simoës-Costa et al., 2015), через 90–120 дней (Moura et al., 2015; Babenko et al., 2018) и через 6 месяцев (Fernandez et al., 1993; Renner, Randi, 2004). Также, появление молодых спорофитов было отмечено после 1 года существования культуры гаметофитов в работе (Mikula et al., 2015). Для нескольких видов древовидных папоротников время появления спорофитов варьировало от 4 до 14 месяцев (Goller, Rybczynski, 2007). На срок образования спорофитов влияет состав питательной среды: для гаметофитов *Cyathea australis* появление спорофитов варьировало от 46 до 83 дней в зависимости от питательной среды (Moura et al., 2012).

Развитие спорофитов *Osmunda regalis* наступало раньше и в большем количестве на питательных средах с наименьшим содержанием солей МС (1/8 по сравнению с 1/4 и 1/2), а исключение нитрата аммония из среды значительно усиливало рост спорофитов (Makowski et al., 2016). У *Cyathea lepifera* крайне разбавленный раствор МС (1/80) был наиболее эффективным для образования спорофитов по сравнению с менее разбавленными растворами (Kuriyama et al., 2004). Исключение солей и сахарозы из питательной среды вело к увеличению числа

спорофитов в гомогенизированной культуре гаметофитов (Fernandez et al., 1997a). С другой стороны, показано положительное влияние дигидрофосфата натрия на образование спорофитов *Asplenium nidus* (Khan et al., 2008) и четырех видов древовидных папоротников (Moura et al., 2012). В работах (Moura et al., 2015; Simoes-Costa et al., 2015) добавление  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в питательную среду существенно не влияло на количество спорофитов. Таким образом, дигидрофосфат натрия, вероятно, в зависимости от вида папоротника может облегчать получение спорофитов, либо вовсе не вызывать никаких изменений.

Гомогенизация ткани спорофитов, выращенных в асептических условиях, также нашла применение для воспроизводства новых растений (Fernandez et al., 1993). Культивирование гомогенатов спорофитов нескольких видов папоротников на жидкой среде МС способствовало преимущественному развитию спорофитов, однако в присутствии БАП (4,4 мкМ) одни виды (*Adiantum capillus-veneris*, *Davallia canariensis*, *Polypodium cambricum*) давали недифференцированные агрегаты клеток и апоспоровые гаметофиты, другие (*Asplenium adiantum-nigrum*) – спорофиты и гаметофиты в близких пропорциях (Somer et al., 2010). Гомогенат спорофитов *Asplenium nidus* регенерировал как новые спорофиты, так и апоспоровые гаметофиты (Fernandez et al., 1993). Добавление регуляторов роста к гомогенизированной культуре спорофита *A. nidus* имело разнонаправленное действие (Menendez et al., 2011): ГКЗ и БАП вызывало образование пролиферирующих структур, которые не вели к формированию спорофитов, тогда как ИУК способствовала росту спорофитов. Различные сочетания БАП и 2,4-дихрофеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) стимулировали образование гаметофитов на эксплантах спорофитов *Rumohra adiantiformis*, выращенных *in vitro* (Avila-Perez et al., 2011). Образование апоспоровых гаметофитов возможно также на среде без регуляторов роста (Avila-Perez et al., 2011; Menendez et al., 2011). Кинетин в сочетании с ИУК способствовал увеличению массы спорофитов *Dipteris wallichii* (Singha et al., 2013b). Апогамное развитие спорофитов на гаметофитах *Pteris tripartita* вызывали как цитокининами (БАП, Кин), так и ГКЗ в высоких концентрациях (1–5 мг/л, оптимум при 4 мг/л) (Ravi et al., 2015).

### 3.4. Укоренение и акклиматизация

Образование корней может происходить спонтанно на культуральной среде в отсутствие регуляторов роста (Avila-Perez et al., 2011; Haddad, Bayerly, 2014). Способность ауксинов стимулиро-

вать корнеобразование была показана в ряде работ, хотя тип ауксина и оптимальные концентрации различались. НУК в концентрации 0,01 мг/л увеличивал количество и длину корней *Rumohra adiantiformis* (Avila-Perez et al., 2011). Укоренение спорофитов *Asplenium nidus* было оптимальным при концентрации индолилмасляной кислоты (ИМК) 2 мг/л (Khan et al., 2008). Также для *A. nidus* было обнаружено, что НУК стимулировал образование корней, увеличивал количество укорененных растений, увеличивал длину корней при оптимальной концентрации 1 мг/л (Haddad, Bayerly, 2014). Для укоренения *Adiantum capillus-veneris* использовали сочетание ауксинов – 2,4-Д и ИМК, проявлявших максимальный эффект при довольно высоких концентрациях: 0,75 и 1,50 мкМ, соответственно (Maridass et al., 2010). Спорофиты способны образовывать корни в присутствии цитокининов в сочетании с ауксинами (Кин и ИУК для *Dipteris wallichii*) (Singha et al., 2013b), так и в отсутствие последних (БАП или Кин для *Pteris tripartita*) (Ravi et al., 2015). Для *P. tripartita* также было показано стимулирующее действие гиббереллина ГКЗ (Ravi et al., 2015). В некоторых случаях молодые спорофиты переносили на субстрат для акклиматизации без предварительного укоренения (Moura et al., 2015).

Для акклиматизации сформировавшиеся спорофиты (Marimuthu, Manickam, 2011; Ravi et al., 2015) или группы гаметофитов (Wu et al., 2010; Jang et al., 2017) отмывают от остатков агара в проточной воде для уменьшения последующего заражения и пересаживают в предварительно стерилизованные горшки с субстратом, которые помещают в атмосферу с высокой влажностью (70–95%). В качестве субстрата обычно используют торф и смеси на его основе (Wu et al., 2010; Simoes-Costa et al., 2015; Moura et al., 2015). Однако для определенных видов рекомендуют использовать песок (Khan et al., 2008), комбинации песка и навоза (Haddad, Bayerly, 2014), смесь песка, садовой земли и навоза (1:2:1) (Marimuthu, Manickam, 2011); смесь песка, земли и вермикулита (1:1:1) (Ravi et al., 2015), смесь земли и разложившегося гранита (2:1) (Jang et al., 2017). Для поддержания высокой влажности могут применяться климатические камеры, теплицы с установками искусственного тумана или пленочные укрытия. При этом необходимо осуществлять своевременный полив растений. Температура поддерживается на уровне 22–25°C, фотопериод обычно составляет 16 ч. Влажность воздуха постепенно снижают до уровня окружающей среды, приоткрывая пленочные укрытия или путем постепенного перфорирования пленки.

#### 4. Заключение

Как следует из приведенного обзора, накоплен обширный материал по культивированию папоротников в условиях *in vitro*. Исходя из литературных данных, условия введения в культуру *in vitro* разных видов папоротников могут значительно различаться. Такие факторы, как состав питательной среды, наличие регуляторов роста, свет, температура, влажность, pH имеют большое значение для успешного размножения. Это обуславливает необходимость подбора оптимальных условий для каждого вида папоротника, который предполагается размножать в условиях *in vitro*. Тем не менее, литературные данные позволяют тестировать уже известные варианты оптимальных условий культивирования и модифицировать их для конкретных видов.

#### Список литературы

- [Arnautova] Арнаутова Е.М. 2008. Гаметофиты равноспоровых папоротников. СПб. 456 с.
- Atallah N.M., Banks J.A. 2015. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front. Plant Sci.* 6: 100–107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00100>
- Avila-Perez M.C.R., White-Olascoaga L., Arzate-Fernandez A.M. 2011. *In vitro* regeneration of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis* (G.Forst.) Ching). *Amer. Fern J.* 101: 25–35. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-101.1.25>
- Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A., Kosakivska I.V. 2018. Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte *in vitro* culture. *Cyt. Gen.* 52(2): 117–126. <https://doi.org/10.3103/s0095452718020032>
- Ballesteros D., Pence V.C. 2018. Fern conservation: spore, gametophyte, and sporophyte *ex situ* storage, *in vitro* culture, and cryopreservation. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 227–249 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_11)
- Basile A., Spagnuolo V., Giordano S., Sorrentino C., Lavitola A., Castaldo-cobianchi R. 1997. Induction of antibacterial activity by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in *Nephrolepis* sp. (pteridophyta). *Int. J. Antimicrob Agents.* 8(2): 131–134. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(96\)00365-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(96)00365-2)
- Baskaran X., Geo Vigila A., Zhang S., Feng S., Liao W. 2018. A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 19(1): 85–119. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600344>
- Camloh M. 1999. Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. *Amer. Fern J.* 89(2): 124–132. <https://doi.org/10.2307/1547346>
- Camloh M., Ambrozic-Dolinsek J. 2010. *In vitro* regeneration systems of *Platyserium*. In: *Working with ferns*. New York – Dordrecht – Heidelberg – London. 111–125 pp. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3_8)
- Camloh M., Ravnikar M., Zel J. 1996. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation rhizoids and early development of gametophytes. *Physiol. Plant.* 97: 659–664. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00529.x>
- Castilho C.V.V., Neto J.F.F., Leitao S.G., Barreto C.S., Pinto S.C., Barboza da Silva N.C. 2018. *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* *in vitro* culture: sporophyte development and volatile compound profile of an aromatic fern. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 133(3): 311–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1383-z>
- Chang H.C., Agrawal D.C., Kuo C.L., Wen J.-L., Chen C.C., Tsay H.S. 2007. *In vitro* culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine “Gu-Sui-Bu”. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43(2): 133–139. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9037-6>
- Christenhusz M.J.M., Chase M.W. 2014. Trends and concepts in fern classification. *Ann. Bot.* 113(4): 571–594. <https://doi.org/10.1093/aob/mct299>
- Crowe A. 1997. A field guide to the native edible plants of New Zealand. Auckland, New Zealand. 192 pp.
- de Vargas I.B., Droste A. 2014. *In vitro* propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. *Rev. Biol. Trop.* 62(1): 299–308.
- Dhir B. 2018. Role of ferns in environmental cleanup. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 517–531 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_25)
- Döpp W. 1950. Eine die Aanthridienbildung bei Farnen fördernde Substanz in den Prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 63: 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1951.tb01498.x>
- DutchGlory. 2018. Vitro Plus boosts production capacity. Available at: <http://dutchglory.com/2018/03/08/vitro-plus-boosts-production-capacity> (Accessed 22.10.2018).
- Dyer A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: *Experimental biology of ferns*. London. 253–305 pp.
- Fang Y.-H., Li X., Bai S.-N., Rao G.-Y. 2017. Sugar treatments can induce *AcLEAFY COTYLEDON1* expression and trigger the accumulation of storage products during prothallus development of *Adiantum capillus-venereis*. *Front. Plant Sci.* 8 (Article 541): 11 pp. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00541>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1993. *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. *Sci. Hortic.* 56(1): 71–77. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(93\)90103-w](https://doi.org/10.1016/0304-4238(93)90103-w)
- Fernandez H., Bertrand A.M., Feito I., Sanchez-Tames R. 1997a. Gametophyte culture *in vitro* and antheridiogen activity in *Blechnum spicant*. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 50(1): 71–74. <https://doi.org/10.1023/A:1005962726905>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1997b. Gemination in cultured gametophytes of *Osmunda rega-*

- lis. Plant. Cell. Rep. 16: 358–362. <https://doi.org/10.1007/BF01088297>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1999. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 56(3): 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1006277229136>
- Fernandez H., Revilla M.A. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 73(1): 1–13. <https://doi.org/10.1023/A:1022650701341>
- Foster A.S., Gifford E.M. 1974. Comparative morphology of vascular plants. San Francisco. 751 pp.
- Froissard D., Fons F., Bessiere J.M., Buatois B., Rapior S. 2011. Volatiles of French ferns and "fougère" scent in perfumery. *Nat. Prod. Commun.* 6(11): 1723–1726.
- Goller K., Rybczynski J.J. 2007. Gametophyte and sporophyte of tree ferns *in vitro* culture. *Acta Soc. Bot. Pol.* 76: 193–199. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.022>
- Goswami H.K., Sen K., Mukhopadhyay R. 2016. Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants. *Plant Gen. Res.* 14(4): 328–355. <https://doi.org/10.1017/S1479262116000290>
- Greer G.K., Dietrich M.A., DeVol J.A., Rebert A. 2012. The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* gametophytes. *Amer. Fern J.* 102(1): 32–46. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-102.1.32>
- Guillon J.M., Raquin C. 2002. Environmental sex determination in the genus *Equisetum*: sugars induce male sex expression in cultured gametophytes. *Int. J. Plant Sci.* 163(5): 825–830. <https://doi.org/10.1086/341229>
- Haddad S., Bayerly R. 2014. *In vitro* propagation of ferns (*Asplenium nidus*) via spores culture. *Jord. J. Agricult. Sci.* 10(1): 144–153. <https://doi.org/10.12816/0029880>
- Hauffler 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: revisiting the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience.* 66(11): 928–937. <https://doi.org/10.1093/biosci/biw108>
- Hedge S., Menon V.K., Noronha R., D'Souza L. 2006. Callus culture and an unconventional pattern of sporophyte regeneration in *Drynaria quercifolia* – a medicinal fern. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42(6): 508–513. <https://doi.org/10.1079/ivp2006810>
- Hicks G., von Aderkas P. 1986. A tissue culture of the ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 5(3): 199–204. <https://doi.org/10.1007/bf00040130>
- Higuchi H., Amaki W. 1989. Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. *Sci. Hortic.* 37(4): 351–359. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90146-5)
- Ito M. 1969. Intracellular position of nuclear division in protonema of *Pteris vittata*. *Dev. Grow. Differ.* 10(3-4): 273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.1969.00273.pp.x>
- Jang B.K., Cho J.S., Lee K.C., Lee C.H. 2017. Culture conditions affecting spore germination, prothallus propagation and sporophyte formation of *Dryopteris nipponensis* Koidz. *Hortic. Sci. Tech.* 35(4): 480–489. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170051>
- Johari D., Singh A.P. 2018. Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns. In: *Current advances in fern research.* Cham, Switzerland. 75–97 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_4)
- Johns R.J., Edwards P.J. 1991. Vegetative reproduction in pteridophytes. *Curtis's Bot. Mag.* 8(3): 109–112. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.1991.tb00370.x>
- Joyce B.L., Eda S., Dunlap J. Stewart C.N. 2014. Morphology and ploidy level determination of *Pteris vittata* callus during induction and regeneration. *BMC Biotech.* 14(96): 8 pp. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0096-6>
- Khan S., Raziq M., Kayani H.A. 2008. *In vitro* propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. *Pak. J. Bot.* 40(1): 91–97.
- [Khrapko] Храпко О.В. 2007. Дальневосточные папоротники: возможности использования. Бюлл. БСИ ДВО РАН [Электронный ресурс]: науч. журн. Ботан. сад-институт ДВО РАН. Вып. 1(1). С. 81–87. <http://botsad.ru/journal/number1.htm>
- Knop W. 1865. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungs-Prozess der Pflanzen. *Landwirtsch. Versuchsstat. Pol.* 7: 93–107.
- Klekowski E.J. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. *Bot. J. Lin. Soc.* 62(3): 361–377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1969.tb01973.x>
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer. Orq. Soc. Bul.* 15: 214–217.
- Kodym A., Lang M., Delpratt J. 2016. Propagation by partial tissue culture of austral bracken (*Pteridium esculentum*) for revegetation. *Ecol. Manag. Restorat.* 17:159–163. <https://doi.org/10.1111/emr.12209>
- [Kreshchenok] Крещенок И.А. 2008. Возможности лекарственного использования дальневосточных видов рода *Dryopteris*. Региональные проблемы. Вып. 10. С. 76–78.
- Kuriyama A., Hojoh T., Sugawara Y., Matsushima H., Takeuchi M. 1989. A method for the rapid growth in culture of gametophytes of *Equisetum arvense* with antheridia. *Plant Cell Physiol.* 30(8): 1189–1192. <https://doi.org/doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a077864>
- Kuriyama A., Takeuchi M., Kawai F., Kanamori M. 1992. Roles of inorganic nitrogen in gametophytic growth and in initiation and development of sporophytic shoots of *Equisetum arvense*. *Plant Cell Physiol.* 33: 647–650. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078300>
- Kuriyama A., Kobayashi T., Maeda M. 2004. Production of sporophytic plants of *Cyathea lepifera*, a tree fern, from *in vitro* cultured gametophyte. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 73(2): 140–142. <https://doi.org/10.2503/jjshs.73.140>
- Li X., Fang Y.-H., Yang J., Bai S.-N., Rao G.-Y. 2013. Overview of the morphology, anatomy, and ontogeny of *Adiantum capillus-veneris*: an experimental system to study the development of ferns. *J. System. Evol.* 51(5): 499.
- Liu H.-M., Dyer R.J., Guo Z.-Y., Meng Z., Li J.-H., Schneider H. 2012a. The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from *Polystichoid* ferns. *J. Bot.* 2012: 510478. <https://doi.org/10.1155/2012/510478>
- Liu Y., Wujisguleng W., Long C. 2012b. Food uses of ferns in China: a review. *Acta Soc. Bot. Pol.* 81(4): 263–270. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.046>

- Makowski D., Tomiczak K., Rybczynski J.J., Mikula A. 2016. Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. Acta Physiol. Plant. 38: 19. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2037-y>
- Maridass M., Mahesh R., Raju G., Muthuchelian K. 2010. Clonal propagation of *Adiantum capillus-veneris*. Int. J. Biol. Tech. 1(1): 33–37.
- Marimuthu J., Manickam V.S. 2011. *Ex situ* conservation of two threatened ferns of the western ghats through *in vitro* spore culture. J. Threat. Taxa. 3(7): 1919–1928. <https://doi.org/10.11609/JoTT.o2687.1919-28>
- Maroyi A. 2014. Not just minor wild edible forest products: consumption of pteridophytes in sub-Saharan Africa. J. Ethnobiol. Ethnomed. 10: 78. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-78>
- Martin K.P., Sini S., Zhang C.-L., Slater A., Madhusoodanan P.V. 2006. Efficient induction of apospory and apogamy *in vitro* in silver fern (*Pityrogramma calomelanos* L.). Plant Cell Rep. 25(12): 1300–1307. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0215-5>
- Menendez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernandez H. 2011. The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L. Acta Physiol. Plant. 33(6): 2493–2500. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9>
- Menendez V., Arbesu R., Somer M., Revilla A., Fernandez H. 2010. From spore to sporophyte: how to proceed *in vitro*. In: Working with ferns. New York – Dordrecht – Heidelberg – London. 97–110 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3>
- Menendez V., Revilla M.A., Fal M.A., Fernandez H. 2009. The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L. Plant Cell Tis. Organ Cult. 96(3): 245–250. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9481-y>
- Meyer B.S., Anderson D.B., Swanson C.A. 1955. Plant physiology. 2nd ed. New York. 168 pp.
- Mikula A., Jata K., Rybczynski J.J. 2009. Cryopreservation strategies for *Cyathea australis* (R. Br.) Domin. Cryo-Letters. 30(6): 429–439.
- Mikula A., Pozoga M., Tomiczak K., Rybczynski J.J. 2015. Somatic embryogenesis in ferns: a new experimental system. Plant Cell Rep. 34(5): 783–794. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1741-9>
- Miller J.H., Miller P.M. 1961. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern, *Onoclea sensibilis*. Amer. J. Bot. 48(2): 154–159. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1961.tb11619.x>
- Miller J.H., Miller P.M. 1965. The relationship between the promotion of elongation of fern protonemata by light and growth substances. Amer. J. Bot. 52(9): 871–876. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1965.tb07260.x>
- Moura I.R., Simoes-Costa M.C., Garcia J., Silva M.J., Duarte M.C. 2012. *In vitro* culture of tree fern spores from Cyatheaceae and Dicksoniaceae families. Acta Hort. 937: 455–461. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.937.55>
- Moura I.R., Simoes-Costa M.C., Silva M.J., Duarte M.C. 2015. Spore-derived *in vitro* cultures from herbarium specimens of cape verde ferns. Acta Hort. 1083: 273–279. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.34>
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nitsch J.P., Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science. 163: 85–87. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.85>
- Page C.N. 2002. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. Rev. Palaeobot. Palyn. 119: 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(01\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(01)00127-0)
- Parajuli J., Joshi S.D. 2014. *In vitro* study of effects of growth hormones on sporophyte development of *Cyathea spinulosa*. Int. J. Biodiv. Conserv. 6(3): 247–255. <https://doi.org/10.5897/IJBC2014.0684>
- Pence V.C. 2014. *In vitro* propagation and cryopreservation of the endangered filmy fern, *Trichomanes punctatum* subsp. *floridanum* (Hymenophyllaceae). Fern Gaz. 19(8): 307–317.
- Pinto S.C., Leitao G.G., Castellar A., D'Elia D.S., Lage C.L.S., Henriques A.B., Fernandes J., Motta G.S., Bizzod H.R., Leitao S.G. 2013. Chemical composition of the volatile fractions from wild and *in vitro* plants of *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Pteridophyta). J. Essent. Oil Res. 25(3): 198–202. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.755477>
- Raghavan V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge. 361 pp. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511529757>
- Ravi B.X., Varuvel G.V.A., Kilimas R., Robert J. 2015. Apogamous sporophyte development through spore reproduction of a South Asia's critically endangered fern: *Pteris tripartita* Sw. Asian Pacif. J. Reprod. 4(2): 135–139. [http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30010-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30010-5)
- Reixach N., Irurre-Santillari J., Casas J., Mele E., Messeguer J., Camps F. 1996. Biosynthesis of ecdysteroids in *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. Phytochem. 43(3): 597–602.
- Reixach N., Irurre-Santillari J., Camps F., Mele E., Messeguer J., Casas J. 1997. Phytoecdysteroid overproduction in *Polypodium vulgare* prothalli. Phytochem. 46(7): 1183–1187. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)80008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)80008-8)
- Renner G.D.R., Randi A.M. 2004. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae). Acta Bot. Bras. 18(2): 375–380. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000200017>
- Rivera A., Canal M.J., Grossniklaus U., Fernandez H. 2018a. The gametophyte of fern: born to reproduce. In: Current advances in fern research. Cham, Switzerland. 3–19 pp. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_1)
- Rivera A., Conde P., Canal M.J., Fernandez H. 2018b. Biotechnology and apogamy in *Dryopteris affinis* spp. *affinis*: the influence of tissue homogenization, auxins, cytokinins, gibberellic acid, and polyamines. In: Current advances in fern research. Cham, Switzerland. 139–152 pp. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_7)
- Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A. 2018. Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro*. In: Current advances in fern re-

- search. Cham, Switzerland. 99–120 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_5)
- Sheffield E., Douglas G.E., Hearne S.J., Huxham S., Wynn J.M. 2001. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media. *Amer. Fern J.* 91(4): 179–186.
- Shin S.-L., Lee C.-H. 2009. *In vitro* medium composition and culture method affecting masspropagation of *Osmunda japonica* Thunb. prothalli. *Kor. J. Hortic. Sci. Tech.* 27(2): 299–304.
- Shukla S.P., Khare P.B. 2014. *In vitro* conservation of some threatened and economically important ferns belonging to the Indian subcontinent. *J. Bot.* 2014: 949028. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/949028>
- Simoes-Costa M.C., Moura I.R., Silva M.J., Duarte, M.C. 2015. *In vitro* culture of spores from *Woodwardia fimbriata* Smith. *Acta Hort.* 1083: 281–285. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.35>
- Singh A.P., Johari D. 2018. Scope of ferns in horticulture and economic development. In: Current advances in fern research. Cham, Switzerland.: 153–175 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_8)
- Singha K.B., Dutta Choudhury M., Mazumder P.B. 2013a. *In vitro* propagation of pteridophytes: a review. *Int. J. Res. Ayuvedu Pharm.* 4(2): 297–303. <http://dx.doi.org/10.7897/2277-4343.04245>
- Singha K.B., Dutta Choudhury M., Mazumder P.B. 2013b. *In vitro* propagation of *Dipteris wallichii* (R.Br.) T. Moore: a hope for conservation of an endangered pteridophyte. *Int. Res. J. Pharm.* 4(3): 215–219. <http://dx.doi.org/10.7897/2230-8407.04346>
- Smith A.R., Pryer K.M., Schuettpelz E., Korall P., Schneider H., Wolf P. 2008. Fern classification. In: Biology and evolution of ferns and lycophytes. 417–467 pp. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541827.017>
- Soare L.C., Visoiu E., Dobrescu C.M. 2010. *In vitro* culture and regeneration of the fern *Dryopteris affinis*, species growing in a protected area. *Roman. Biotech. Let.* 15: 45–54.
- Somer M., Arbesu R., Menendez V., Revilla M.A., Fernandez H. 2010. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. *Euphytica.* 171: 203–210. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0018-1>
- Steeves T.A., Sussex I.M. 1952. *In vitro* culture of a fern callus. *Nature.* 170: 672–673. <https://doi.org/10.1038/170672b0>
- Suo J., Chen S., Zhao Q., Shi L., Dai S. 2015. Fern spore germination in response to environmental factors. *Front. Biol.* 10(4): 358–376. <https://doi.org/10.1007/s11515-015-1342-6>
- Svatos A., Macek T. 1994. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. *Phytochem.* 35(3): 561–654. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90580-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90580-6)
- Thakur R.C., Hosoi Y., Ishii K. 1998. Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.). Todaro – an edible fern. *Plant Cell Rep.* 18: 203–208. <https://doi.org/10.1007/s002990050557>
- [Trutnev] Трутнев Ю.П. и др. (ред.). 2008. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М. 855 с.
- von Aderkas P. 1984. Economic history of ostrich fern, *Matteuccia struthiopteris*, the edible fiddlehead. *Econ. Bot.* 38(1): 14–23.
- Wada M., Furuya M. 1970. Photocontrol of the orientation of cell division in *Adiantum*. Effects of dark and red periods in the apical cell of gametophytes. *Dev. Growth. Differ.* 12(2): 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1970.00109.x>
- Warne T.R., Hickok L.G. 1987. (2-Chloroethyl)phosphonic acid promotes germination of immature spores of *Ceratopteris richardii* Brongn. *Plant Physiol.* 83: 723–725. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.83.4.723>
- Weinberg E.S., Voeller B.R. 1969. Induction of fern spore germination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 64(3): 835–842. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.3.835>
- Wetmore R.H. Morel G. 1949. Polyphenol oxidase as a problem in organ culture and auxin diffusion studies of horsetails and ferns. *Amer. J. Bot. Suppl.* 36: 830.
- Wu H., Liu XQ., Ji H., Chen LQ 2010. Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae). *Sci. Hortic.* 125: 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.004>
- Yoshihara T., Tsunokawa K., Miyano Y., Arashima Y., Hoshida H., Shoji K., Shimada H., Goto F. 2005. Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its cadmium tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Rep.* 23(8): 579–585. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-004-0877-9>

## Fern propagation via spore culture *in vitro* (a review)

© L.A. Shelikhan\*, E.V. Nekrasov

*Amur Branch of Botanical Garden-Institute, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Blagoveshchensk  
e-mail: \*solecito91@mail.ru*

Ferns are highly interesting objects for biotechnology due to their special development and reproduction, knowledge of which is important for the understanding of plant evolution. Ferns are also valuable ornamental and medicinal plants, they have a high potential for production of bioactive compounds. Some fern species are rare or endangered whose conservation is necessary for plant biodiversity. There are enough experimental data on *in vitro* cultivation of ferns which can significantly contribute to the development of abovementioned subjects. The review considers different topics on fern propagation *in vitro* with spores used as explants. The variety of protocols described in literature for cultivation *in vitro* is useful for multiplication of new fern species.

**Keywords:** Polypodiophyta, ferns, spores, gametophyte, sporophyte, *in vitro* culture.

## References

- Arnautova E.M. 2008. *Gametofity ravnosporovykh paporotnikov* [Gametophytes of homosporous ferns]. Saint-Petersburg. 456 pp. (In Russ.)
- Atallah N.M., Banks J.A. 2015. Reproduction and the phenomonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front. Plant Sci.* 6: 100–107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00100>
- Avila-Perez M.C.R., White-Olascoaga L., Arzate-Fernandez A.M. 2011. *In vitro* regeneration of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis* (G.Forst.) Ching). *Amer. Fern J.* 101: 25–35. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-101.1.25>
- Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M., Vasheka O.V., Romanenko P.O., Negretsky V.A, Kosakivska I.V. 2018. Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte *in vitro* culture. *Cyt. Gen.* 52(2): 117–126. <https://doi.org/10.3103/s0095452718020032>
- Ballesteros D., Pence V.C. 2018. Fern conservation: spore, gametophyte, and sporophyte *ex situ* storage, *in vitro* culture, and cryopreservation. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 227–249 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_11)
- Basile A., Spagnuolo V., Giordano S., Sorrentino C., Lavitola A., Castaldo-cobianchi R. 1997. Induction of antibacterial activity by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in *Nephrolepis sp.* (pteridophyta). *Int. J. Antimicrob Agents.* 8(2): 131–134. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(96\)00365-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(96)00365-2)
- Baskaran X., Geo Vigila A., Zhang S., Feng S., Liao W. 2018. A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 19(1): 85–119. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600344>
- Camloh M. 1999. Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. *Amer. Fern J.* 89(2): 124–132. <https://doi.org/10.2307/1547346>
- Camloh M., Ambrozic-Dolinsek J. 2010. *In vitro* regeneration systems of *Platyserium*. In: *Working with ferns*. New York – Dordrecht – Heidelberg – London. 111–125 pp. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3_8)
- Camloh M., Ravnarik M., Zel J. 1996. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation rhizoids and early development of gametophytes. *Physiol. Plant.* 97: 659–664. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00529.x>
- Castilho C.V.V., Neto J.F.F., Leitao S.G., Barreto C.S., Pinto S.C., Barboza da Silva N.C. 2018. *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* *in vitro* culture: sporophyte development and volatile compound profile of an aromatic fern. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 133(3): 311–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1383-z>
- Chang H.C., Agrawal D.C., Kuo C.L., Wen J.-L., Chen C.C., Tsay H.S. 2007. *In vitro* culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine “Gu-Sui-Bu”. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43(2): 133–139. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9037-6>

- Christenhusz M.J.M., Chase M.W. 2014. Trends and concepts in fern classification. *Ann. Bot.* 113(4): 571–594. <https://doi.org/10.1093/aob/mct299>
- Crowe A. 1997. *A field guide to the native edible plants of New Zealand*. Auckland, New Zealand. 192 pp.
- de Vargas I.B., Droste A. 2014. *In vitro* propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. *Rev. Biol. Trop.* 62(1): 299–308.
- Dhir B. 2018. Role of ferns in environmental cleanup. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 517–531 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_25)
- Döpp W. 1950. Eine die Antheridienbildung bei Farnen fördernde Substanz in den Prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 63: 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1951.tb01498.x>
- DutchGlory. 2018. Vitro Plus boosts production capacity. Available at: <http://dutchglory.com/2018/03/08/vitro-plus-boosts-production-capacity> (accessed 22.10.2018).
- Dyer A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: *Experimental biology of ferns*. London. 253–305 pp.
- Fang Y.-H., Li X., Bai S.-N., Rao G.-Y. 2017. Sugar treatments can induce *AcLEAFY COTYLEDON1* expression and trigger the accumulation of storage products during prothallus development of *Adiantum capillus-veneris*. *Front. Plant Sci.* 8 (Article 541): 11 pp. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00541>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1993. *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. *Sci. Hortic.* 56(1): 71–77. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(93\)90103-w](https://doi.org/10.1016/0304-4238(93)90103-w)
- Fernandez H., Bertrand A.M., Feito I., Sanchez-Tames R. 1997a. Gametophyte culture *in vitro* and antheridiogen activity in *Blechnum spicant*. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 50(1): 71–74. <https://doi.org/10.1023/A:1005962726905>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1997b. Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. *Plant. Cell. Rep.* 16: 358–362. <https://doi.org/10.1007/BF01088297>
- Fernandez H., Bertrand A.M., Sanchez-Tames R. 1999. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 56(3): 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1006277229136>
- Fernandez H., Revilla M.A. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 73(1): 1–13. <https://doi.org/10.1023/A:1022650701341>
- Foster A.S., Gifford E.M. 1974. *Comparative morphology of vascular plants*. San Francisco. 751 pp.
- Froissard D., Fons F., Bessiere J.M., Buatois B., Rapior S. 2011. Volatiles of French ferns and "fougère" scent in perfumery. *Nat. Prod. Commun.* 6(11): 1723–1726.
- Goller K., Rybczynski J.J. 2007. Gametophyte and sporophyte of tree ferns *in vitro* culture. *Acta Soc. Bot. Pol.* 76: 193–199. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.022>
- Goswami H.K., Sen K., Mukhopadhyay R. 2016. Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants. *Plant Gen. Res.* 14(4): 328–355. <https://doi.org/10.1017/S1479262116000290>
- Greer G.K., Dietrich M.A., DeVol J.A., Rebert A. 2012. The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* gametophytes. *Amer. Fern J.* 102(1): 32–46. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-102.1.32>
- Guillon J.M., Raquin C. 2002. Environmental sex determination in the genus *Equisetum*: sugars induce male sex expression in cultured gametophytes. *Int. J. Plant Sci.* 163(5): 825–830. <https://doi.org/10.1086/341229>
- Haddad S., Bayerly R. 2014. *In vitro* propagation of ferns (*Asplenium nidus*) via spores culture. *Jord. J. Agric. Sci.* 10(1): 144–153. <https://doi.org/10.12816/0029880>
- 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(11): 928–937. <https://doi.org/10.1093/biosci/biw108>
- Hedge S., Menon V.K., Noronha R., D'Souza L. 2006. Callus culture and an unconventional pattern of sporophyte regeneration in *Drynaria quercifolia* – a medicinal fern. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42(6): 508–513. <https://doi.org/10.1079/ivp2006810>
- Hicks G., von Aderkas P. 1986. A tissue culture of the ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 5(3): 199–204. <https://doi.org/10.1007/bf00040130>
- Higuchi H., Amaki W. 1989. Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. *Sci. Hortic.* 37(4): 351–359. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90146-5)
- Ito M. 1969. Intracellular position of nuclear division in protonema of *Pteris vittata*. *Dev. Grow. Differ.* 10(3-4): 273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.1969.00273.pp.x>
- Jang B.K., Cho J.S., Lee K.C., Lee C.H. 2017. Culture conditions affecting spore germination, prothallus propagation and sporophyte formation of *Dryopteris nipponensis* Koidz. *Hortic. Sci. Tech.* 35(4): 480–489. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170051>

- Johari D., Singh A.P. 2018. Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 75–97 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_4)
- Johns R.J., Edwards P.J. 1991. Vegetative reproduction in pteridophytes. *Curtis's Bot. Mag.* 8(3): 109–112. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.1991.tb00370.x>
- Joyce B.L., Eda S., Dunlap J. Stewart C.N. 2014. Morphology and ploidy level determination of *Pteris vittata* callus during induction and regeneration. *BMC Biotech.* 14(96): 8 pp. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0096-6>
- Khan S., Raziq M., Kayani H.A. 2008. *In vitro* propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. *Pak. J. Bot.* 40(1): 91–97.
- Khrapko O.V. 2007. Dalnevostochnyye paprotniki: vozmozhnosti ispolzovaniya [Far Eastern ferns: possibilities of using]. *Byull. BSI DVO RAN* [Bulletin of the BGI FEB RAS]. 1(1): 81–87. (In Russ.) Available at: <http://botsad.ru/journal/number1.htm> (accessed 16.11.2018)
- Knop W. 1865. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungs-Prozess der Pflanzen. *Landwirtsch. Veruchsstat. Pol.* 7: 93–107.
- Klekowski E.J. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. *Bot. J. Lin. Soc.* 62(3): 361–377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1969.tb01973.x>
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer. Orq. Soc. Bul.* 15: 214–217.
- Kodym A., Lang M., Delpratt J. 2016. Propagation by partial tissue culture of austral bracken (*Pteridium esculentum*) for revegetation. *Ecol. Manag. Restorat.* 17:159–163. <https://doi.org/10.1111/emr.12209>
- Kreshchenok I.A. 2008. Vozmozhnosti lekarstvennogo ispolzovaniya dalnevostochnykh vidov roda *Dryopteris* [Possibilities of medicinal use of Far Eastern species of the genus *Dryopteris*]. *Regionalnye problemy.* 3: 76–78. (In Russ)
- Kuriyama A., Hojoh T., Sugawara Y., Matsushima H., Takeuchi M. 1989. A method for the rapid growth in culture of gametophytes of *Equisetum arvense* with antheridia. *Plant Cell Physiol.* 30(8): 1189–1192. <https://doi.org/doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a077864>
- Kuriyama A., Takeuchi M., Kawai F., Kanamori M. 1992. Roles of inorganic nitrogen in gametophytic growth and in initiation and development of sporophytic shoots of *Equisetum arvense*. *Plant Cell Physiol.* 33: 647–650. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078300>
- Kuriyama A., Kobayashi T., Maeda M. 2004. Production of sporophytic plants of *Cyathea lepifera*, a tree fern, from *in vitro* cultured gametophyte. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 73(2): 140–142. <https://doi.org/10.2503/jjshs.73.140>
- Li X., Fang Y.-H., Yang J., Bai S.-N., Rao G.-Y. 2013. Overview of the morphology, anatomy, and ontogeny of *Adiantum capillus-veneris*: an experimental system to study the development of ferns. *J. System. Evol.* 51(5): 499.
- Liu H.-M., Dyer R.J., Guo Z.-Y., Meng Z., Li J.-H., Schneider H. 2012a. The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from *Polystichoid* ferns. *J. Bot.* 2012: 510478. <https://doi.org/10.1155/2012/510478>
- Liu Y., Wujisguleng W., Long C. 2012b. Food uses of ferns in China: a review. *Acta Soc. Bot. Pol.* 81(4): 263–270. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.046>
- Makowski D., Tomiczak K., Rybczynski J.J., Mikula A. 2016. Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. *Acta Physiol. Plant.* 38: 19. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2037-y>
- Maridass M., Mahesh R., Raju G., Muthuchelian K. 2010. Clonal propagation of *Adiantum capillus-veneris*. *Int. J. Biol. Tech.* 1(1): 33–37.
- Marimuthu J., Manickam V.S. 2011. *Ex situ* conservation of two threatened ferns of the western ghats through *in vitro* spore culture. *J. Threat. Taxa.* 3(7): 1919–1928. <https://doi.org/10.11609/JoTT.o2687.1919-28>
- Maroyi A. 2014. Not just minor wild edible forest products: consumption of pteridophytes in sub-Saharan Africa. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10: 78. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-78>
- Martin K.P., Sini S., Zhang C.-L., Slater A., Madhusoodanan P.V. 2006. Efficient induction of apospory and apogamy *in vitro* in silver fern (*Pityrogramma calomelanos* L.). *Plant Cell Rep.* 25(12): 1300–1307. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0215-5>
- Menendez V., Abul Y., Bohanec B., Lafont F., Fernandez H. 2011. The effect of exogenous and endogenous phytohormones on the *in vitro* development of gametophyte and sporophyte in *Asplenium nidus* L. *Acta Physiol. Plant.* 33(6): 2493–2500. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0794-9>
- Menendez V., Arbesu R., Somer M., Revilla A., Fernandez H. 2010. From spore to sporophyte: how to proceed *in vitro*. In: *Working with ferns*. New York – Dordrecht – Heidelberg – London. 97–110 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3>
- Menendez V., Revilla M.A., Fal M.A., Fernandez H. 2009. The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 96(3): 245–250. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9481-y>

- Meyer B.S., Anderson D.B., Swanson C.A. 1955. *Plant physiology*. 2nd ed. New York. 168 pp.
- Mikula A., Jata K., Rybczynski J.J. 2009. Cryopreservation strategies for *Cyathea australis* (R. Br.) Domin. *CryoLetters*. 30(6): 429–439.
- Mikula A., Pozoga M., Tomiczak K., Rybczynski J.J. 2015. Somatic embryogenesis in ferns: a new experimental system. *Plant Cell Rep.* 34(5): 783–794. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1741-9>
- Miller J.H., Miller P.M. 1961. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern, *Onoclea sensibilis*. *Amer. J. Bot.* 48(2): 154–159. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1961.tb11619.x>
- Miller J.H., Miller P.M. 1965. The relationship between the promotion of elongation of fern protonemata by light and growth substances. *Amer. J. Bot.* 52(9): 871–876. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1965.tb07260.x>
- Moura I.R., Simoes-Costa M.C., Garcia J., Silva M.J., Duarte M.C. 2012. *In vitro* culture of tree fern spores from Cyatheaceae and Dicksoniaceae families. *Acta Hort.* 937: 455–461. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.937.55>
- Moura I.R., Simoes-Costa M.C., Silva M.J., Duarte M.C. 2015. Spore-derived *in vitro* cultures from herbarium specimens of cape verde ferns. *Acta Hort.* 1083: 273–279. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.34>
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nitsch J.P., Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*. 163: 85–87. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.85>
- Page C.N. 2002. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Rev. Palaeobot. Palyn.* 119: 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(01\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(01)00127-0)
- Parajuli J., Joshi S.D. 2014. *In vitro* study of effects of growth hormones on sporophyte development of *Cyathea spinulosa*. *Int. J. Biodiv. Conserv.* 6(3): 247–255. <https://doi.org/10.5897/IJBC2014.0684>
- Pence V.C. 2014. *In vitro* propagation and cryopreservation of the endangered filmy fern, *Trichomanes punctatum* subsp. *floridanum* (Hymenophyllaceae). *Fern Gaz.* 19(8): 307–317.
- Pinto S.C., Leitao G.G., Castellar A., D'Elia D.S., Lage C.L.S., Henriques A.B., Fernandes J., Motta G.S., Biz zod H.R., Leitao S.G. 2013. Chemical composition of the volatile fractions from wild and *in vitro* plants of *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Pteridophyta). *J. Essent. Oil Res.* 25(3): 198–202. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.755477>
- Raghavan V. 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge. 361 pp. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511529757>
- Ravi B.X., Varuvel G.V.A., Kilimas R., Robert J. 2015. Apogamous sporophyte development through spore reproduction of a South Asia's critically endangered fern: *Pteris tripartita* Sw. *Asian Pacif. J. Reprod.* 4(2): 135–139. [http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30010-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30010-5)
- Reixach N., Irurre-Santillari J., Casas J., Mele E., Messeguer J., Camps F. 1996. Biosynthesis of ecdysteroids in *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochem.* 43(3): 597–602.
- Reixach N., Irurre-Santillari J., Camps F., Mele E., Messeguer J., Casas J. 1997. Phytoecdysteroid overproduction in *Polypodium vulgare* prothalli. *Phytochem.* 46(7): 1183–1187. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)80008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)80008-8)
- Renner G.D.R., Randi A.M. 2004. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae). *Acta Bot. Bras.* 18(2): 375–380. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000200017>
- Rivera A., Canal M.J., Grossniklaus U., Fernandez H. 2018a. The gametophyte of fern: born to reproduce. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 3–19 pp. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_1)
- Rivera A., Conde P., Canal M.J., Fernandez H. 2018b. Biotechnology and apogamy in *Dryopteris affinis* spp. *affinis*: the influence of tissue homogenization, auxins, cytokinins, gibberellic acid, and polyamines. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 139–152 pp. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_7)
- Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A. 2018. Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro*. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland. 99–120 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_5)
- Sheffield E., Douglas G.E., Hearne S.J., Huxham S., Wynn J.M. 2001. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media. *Amer. Fern J.* 91(4): 179–186.
- Shin S.-L., Lee C.-H. 2009. *In vitro* medium composition and culture method affecting masspropagation of *Osmunda japonica* Thunb. prothalli. *Kor. J. Hortic. Sci. Tech.* 27(2): 299–304.

- Shukla S.P., Khare P.B. 2014. *In vitro* conservation of some threatened and economically important ferns belonging to the Indian subcontinent. *J. Bot.* 2014: 949028. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/949028>
- Simoës-Costa M.C., Moura I.R., Silva M.J., Duarte, M.C. 2015. *In vitro* culture of spores from *Woodwardia fimbriata* Smith. *Acta Hort.* 1083: 281–285. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.35>
- Singh A.P., Johari D. 2018. Scope of ferns in horticulture and economic development. In: *Current advances in fern research*. Cham, Switzerland.: 153–175 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_8)
- Singha K.B., Dutta Choudhury M., Mazumder P.B. 2013a. *In vitro* propagation of pteridophytes: a review. *Int. J. Res. Ayuvedu Pharm.* 4(2): 297–303. <http://dx.doi.org/10.7897/2277-4343.04245>
- Singha K.B., Dutta Choudhury M., Mazumder P.B. 2013b. *In vitro* propagation of *Dipteris wallichii* (R.Br.) T. Moore: a hope for conservation of an endangered pteridophyte. *Int. Res. J. Pharm.* 4(3): 215–219. <http://dx.doi.org/10.7897/2230-8407.04346>
- Smith A.R., Pryer K.M., Schuettpelz E., Korall P., Schneider H., Wolf P. 2008. Fern classification. In: *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. 417–467 pp. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541827.017>
- Soare L.C., Visoiu E., Dobrescu C.M. 2010. *In vitro* culture and regeneration of the fern *Dryopteris affinis*, species growing in a protected area. *Roman. Biotech. Let.* 15: 45–54.
- Somer M., Arbesu R., Menendez V., Revilla M.A., Fernandez H. 2010. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. *Euphytica*. 171: 203–210. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0018-1>
- Steeves T.A., Sussex I.M. 1952. *In vitro* culture of a fern callus. *Nature*. 170: 672–673. <https://doi.org/10.1038/170672b0>
- Suo J., Chen S., Zhao Q., Shi L., Dai S. 2015. Fern spore germination in response to environmental factors. *Front. Biol.* 10(4): 358–376. <https://doi.org/10.1007/s11515-015-1342-6>
- Svatos A., Macek T. 1994. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. *Phytochem.* 35(3): 561–654. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90580-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90580-6)
- Thakur R.C., Hosoi Y., Ishii K. 1998. Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.). Todaro – an edible fern. *Plant Cell Rep.* 18: 203–208. <https://doi.org/10.1007/s002990050557>
- Trutnev Yu.P. et al. (ed.). 2008. *Krasnaya kniga Rossiiskoi Federatsii (rasteniya i griby)* [Red book of the Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow. 855 pp. (In Russ.)
- von Aderkas P. 1984. Economic history of ostrich fern, *Matteuccia struthiopteris*, the edible fiddlehead. *Econ. Bot.* 38(1): 14–23.
- Wada M., Furuya M. 1970. Photocontrol of the orientation of cell division in *Adiantum*. Effects of dark and red periods in the apical cell of gametophytes. *Dev. Growth. Differ.* 12(2): 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1970.00109.x>
- Warne T.R., Hickok L.G. 1987. (2-Chloroethyl)phosphonic acid promotes germination of immature spores of *Ceratopteris richardii* Brongn. *Plant Physiol.* 83: 723–725. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.83.4.723>
- Weinberg E.S., Voeller B.R. 1969. Induction of fern spore germination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 64(3): 835–842. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.3.835>
- Wetmore R.H. Morel G. 1949. Polyphenol oxidase as a problem in organ culture and auxin diffusion studies of horsetails and ferns. *Amer. J. Bot.* Suppl. 36: 830.
- Wu H., Liu XQ., Ji H., Chen LQ 2010. Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae). *Sci. Hortic.* 125: 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.004>
- Yoshihara T., Tsunokawa K., Miyano Y., Arashima Y., Hoshida H., Shoji K., Shimada H., Goto F. 2005. Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its cadmium tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Rep.* 23(8): 579–585. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-004-0877-9>