

Научная статья

УДК 576.316

DOI: 10.37482/0536-1036-2026-2-73-87

## Технология клонального микроразмножения реликтовых голосеменных растений *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.

С.М. Зайцева<sup>1,3</sup>✉, канд. биол. наук, доц.; ResearcherID: [AAE-5391-2022](https://orcid.org/0000-0001-9137-3774),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9137-3774>

Е.Л. Болотина<sup>1</sup>, аспирант; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9006-6044>

Е.А. Калашникова<sup>2</sup>, д-р биол. наук, проф.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2655-1789>

Р.Н. Киракосян<sup>1</sup>, канд. биол. наук, доц.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5244-4311>

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, д. 49, Москва, Россия, 127434; smzaytseva@yandex.ru✉, lizavetarodbol@yandex.ru, mia41291@mail.ru

<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, ул. Ботаническая, д. 35, Москва, Россия, 127276; kalash0407@mail.ru

<sup>3</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, ул. Академика Скрябина, д. 23, Москва, Россия, 109472; smzaytseva@yandex.ru✉


Поступила в редакцию 12.02.25 / Одобрена после рецензирования 18.05.25 / Принята к печати 19.05.25

**Аннотация.** *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. – самое высокое реликтовое растение, способное накапливать уникальные вторичные метаболиты, которые могут найти применение в фармакогнозии. Секвойя вечнозеленая репродуктивно уязвима, поэтому особую актуальность приобретают методы биотехнологии для создания генетических банков и биоресурсных коллекций *in vitro*. Объектом исследования служили черенки *S. sempervirens*, заготовленные с дерева, произрастающего в фондовой оранжерее Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (Москва). В работе изучали связь минерального и гормонального составов питательной среды, а также расположения части побега, с которой изолирован черенок, и эффективности размножения секвойи *in vitro*. Ступенчатая стерилизация 0,1%-м раствором хлорида ртути в течение 18 мин приводила к получению хорошо растущей стерильной культуры (более 80 %). Установлено, что первоначально необходимо выращивать черенки на безгормональной питательной среде, содержащей минеральные соли по MS, а в дальнейшем на среде, в состав которой включены 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты + 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина + 0,5 мг/л нафталинукусной кислоты либо 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты + 2 мг/л N6-(дельта-2-изопентенил)-аденина для размножения. Для укоренения целесообразно переносить регенеранты на питательную среду с 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты + 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина + 0,5 мг/л нафталинукусной кислоты в составе. После формирования клонами корневой системы они помещаются в почвенный субстрат под полиэтиленовое укрытие при 16-часовом фотопериоде для адаптации к условиям *ex vitro*.

**Ключевые слова:** *Sequoia*, клоны, реликтовые голосеменные растения, *in vitro*

**Благодарности:** Коллектив авторов выражает признательность агроному Главного Ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН Кучерову Антону Валерьевичу за предоставление растительного материала. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 24-76-00070 «Получение клеточных культур *in vitro* реликтовых и находящихся под угрозой исчезновения голосеменных растений рода *Sequoia* и изучение биологической активности ее метаболитов» (РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева).

© Зайцева С.М., Болотина Е.Л., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., 2026

 Статья опубликована в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии CC BY 4.0

**Для цитирования:** Зайцева С.М., Болотина Е.Л., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Технология клонального микроразмножения реликтовых голосеменных растений *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. // Изв. вузов. Лесн. журн. 2026. № 2. С. 73–87. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2026-2-73-87>

Original article

## Clonal Micropropagation Technology of Relict Gymnosperms *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.

**Svetlana M. Zaytseva**<sup>1,3</sup>✉, *Candidate of Biology, Assoc. Prof.*; ResearcherID: [AAE-5391-2022](https://orcid.org/0000-0001-9137-3774), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9137-3774>

**Elizaveta L. Bolotina**<sup>1</sup>, *Postgraduate Student*; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9006-6044>

**Elena A. Kalashnikova**<sup>2</sup>, *Doctor of Biology, Prof.*; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2655-1789>

**Rima N. Kirakosyan**<sup>1</sup>, *Candidate of Biology, Assoc. Prof.*;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5244-4311>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, ul. Timiryazevskaya, 49, Moscow, Russian Federation, 127434; [smzaytseva@yandex.ru](mailto:smzaytseva@yandex.ru)✉, [lizavetarodbol@yandex.ru](mailto:lizavetarodbol@yandex.ru), [mia41291@mail.ru](mailto:mia41291@mail.ru)

<sup>2</sup>Department of Cell Biology and Biotechnology, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya, 35, Moscow, Russian Federation, 127276; [kalash0407@mail.ru](mailto:kalash0407@mail.ru)

<sup>3</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Scriabin, ul. Akademika Skryabina, 23, Moscow, Russian Federation, 109472; [smzaytseva@yandex.ru](mailto:smzaytseva@yandex.ru)✉

Received on February 12, 2025 / Approved after reviewing on May 18, 2025 / Accepted on May 19, 2025

**Abstract.** *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. is the tallest relict plants capable of accumulating unique secondary metabolites that can be used in pharmacognosy. Given the documented reproductive vulnerability of the coast redwood, biotechnological methods for establishing *in vitro* genetic banks and bioresource collections are increasingly relevant for the preservation of its gene pool. This study utilized nodal segments of *S. sempervirens* harvested from a donor tree maintained in the stock greenhouse of the N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (Moscow). The research investigates the effects of mineral and hormonal nutrient media compositions, as well as the explant's original position on the shoot, on *in vitro* propagation efficiency. Stepwise sterilization using a 0.1 % (w/v) mercuric chloride solution for 18 min resulted in a successful sterile culture rate exceeding 80 %. Findings indicate that explants should initially be cultured on a hormone-free Murashige and Skoog (MS) basal medium, followed by a proliferation medium supplemented with either 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA or 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 2iP for effective multiplication. For rooting, it is advisable to transfer regenerants to a medium containing 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA. Following the development of the root system, the resulting clones are prepared for *ex vitro* transfer. Acclimatization is conducted in a soil substrate under a polyethylene cover with a 16-hour photoperiod to support the transition to *ex vitro* conditions.

**Keywords:** *Sequoia sempervirens*, clones, relict plants, *in vitro*

**Acknowledgements:** The team of authors expresses its gratitude to Anton V. Kucherov, agronomist of the N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, for providing plant material. The study was carried out as part of the research project No. 24-76-00070.

**For citation:** Zaytseva S.M., Bolotina E.L., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. Clonal Micropropagation Technology of Relict Gymnosperms *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Lesnoy Zhurnal* = Russian Forestry Journal, 2026, no. 2, pp. 73–87. (In Russ.).  
<https://doi.org/10.37482/0536-1036-2026-2-73-87>

### Введение

*Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. – это эндемичное и самое высокое реликтовое растение, характеризующееся ограниченным ареалом – узкая полоса вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки, от штата Калифорния до штата Орегон. Доступность почвенной влаги и частота образования туманов являются решающими факторами для определения среды обитания секвойи вечнозеленой [18, 21]. В природных популяциях высота единичных экземпляров этого растения достигает более 100 м, а возраст некоторых деревьев оценивается более чем в 2500 лет [12, 13, 15, 16, 23, 33, 34, 36].

Несмотря на уникальные климатические условия в естественном ареале, коэффициент размножения секвойи вечнозеленой при помощи семян невысокий, в т. ч. из-за аномалии в развитии эмбрионов и низкого уровня выработки пыльцы. Только одно из миллиона семян гигантской секвойи прорастает в естественных условиях. При этом выживаемость саженцев в течение 1,5 года составляет всего 1,4 %. Взрослое дерево крайне редко способно дать больше 1 выжившего саженца за десятилетие [27].

Для секвойи вечнозеленой отмечена физиологическая особенность, способствующая сохранению этого уникального растения, – способность возобновляться порослью [30]. Молодые побеги отрастают от пня или сломанного живого ствола, формируя новый молодой ствол. В ходе исследования возрастных насаждений обнаружено, что значительное количество стволов секвойи не обособлены генетически, а представляют собой отростки более крупных деревьев и, таким образом, являются результатом клонирования, а не размножения семенами [32]. Однако в некоторых случаях отмечено, что не все стебли в «волшебном кольце» были идентифицированы как часть одного и того же клона [17]. Предполагается, что молодая поросль растений, входящих в структуру «волшебного кольца», может получать углеводы, воду и питательные вещества от деревьев, растущих рядом с ними, что позволяет секвойям вытеснять другие хвойные деревья и восстанавливаться даже в глубокой тени под собственным пологом. Это объясняет феномен выживания «белых секвой», лишенных хлорофилла, когда они полностью зависят от корневой системы деревьев, растущих рядом с ними. Таким образом, распространение клонов может влиять на генетическую структуру внутри и между популяциями секвойи, эффективную численность популяции, естественный отбор и эволюцию географического ареала [19].

Для секвойи характерен еще один способ вегетативного размножения, в основе которого лежат метаморфозы ткани ствола в виде множественных наплывов с латентными почками внутри – капами. Формирование капа (стволового или прикорневого) всегда связано с развитием спящих почек. Хвойные породы значительно реже образуют капы по сравнению с покрытосеменными растениями [4].

Секвойя имеет ценную древесину, характеризующуюся долговечностью, устойчивостью к огню, гниению и патогенам, накоплением уникальных метаболитов, не имеющих синтетических аналогов [14, 15, 22, 29, 35, 37]. Растительные

экстракты секвойи вечнозеленой оказывают мощное антиоксидантное действие и могут использоваться в качестве препаратов с широким спектром действия, в частности, ингибировать рост раковых клеток человека [24]. Вероятно, такие свойства обусловлены активным синтезом вторичных метаболитов, что характерно для определенных представителей голосеменных растений [8, 10]. Ранее нами было показано, что клеточные культуры секвойи вечнозеленой способны накапливать значительное количество вторичных метаболитов, в т. ч. и фенольной природы, которые могут найти применение в фармакогнозии [2]. Итак, секвойя представляет интерес не только для лесной, но и для фармакологической промышленности.

В настоящее время особенно остро стоит вопрос истощения природных популяций дикорастущих растений. Под угрозу исчезновения в первую очередь попадают реликтовые и имеющие высокую народно-хозяйственную ценность растения. Как правило, это происходит из-за чрезмерной антропогенной нагрузки, включающей уничтожение ареала произрастания, в т. ч. в связи со слишком большим и неконтролируемым сбором продуктов леса. Несмотря на уникальные морфо-физиологические особенности секвойи, способствующие реализации стрессотолерантной стратегии выживания, эти растения относятся к реликтовым видам и имеют ограниченный, узкоспециализированный эндемичный ареал распространения в природе [9, 13, 31]. Поэтому на данный момент большое практическое значение приобретают технологии, позволяющие проводить возобновление растительного материала секвойи без его изъятия из природной среды. В связи с этим для сохранения биоразнообразия редких, лекарственных, а также исчезающих видов растений целесообразно применять методы биотехнологии и создавать генетические банки *in vitro*. К таким технологиям относятся методы культуры тканей *in vitro*, среди которых наиболее результативным является метод клонального микроразмножения. Он позволяет исследователям круглогодично работать с ограниченным объемом исходного материала в лабораторных условиях и в дальнейшем получать генетически стабильный, здоровый посадочный материал с высоким коэффициентом размножения. Например, исследователями был представлен способ размножения *in vitro* секвойядендрона гигантского (*Sequoiadendron giganteum*) и кедра сибирского (*Pinus sibirica*) [5, 6]. Однако недостатком методов является получение растений-регенерантов из каллусной ткани, что приводит к проявлению соматоклональной вариабельности и не обеспечивает генетической стабильности посадочного материала.

Анализ литературных данных показывает, что большинство исследований направлено на разработку методов, повышающих естественное возобновление секвойи и учитывающих ее морфо-физиологические особенности [17, 22]. Что касается работ по получению культур *in vitro* растений рода *Sequoia* как потенциальных источников гомогенных и генетически стабильных популяций, обладающих ценными вторичными метаболитами, то они малочисленны [1, 20]. Необходима разработка технологии *in vitro* для быстрого получения высококачественных растений *S. sempervirens*, обладающих устойчивостью к биотическим стрессам окружающей среды и высокой продуктивностью по отношению к синтезу вторичных метаболитов. Кроме того, особую актуальность приобретает разработка мероприятий, способствующих стабильному укоренению [26] и адаптации растений-регенерантов в условиях *ex vitro*.

Цель настоящей работы – предложить высокоэффективную технологию массового получения в условиях *in vitro* клонов *S. sempervirens* с их последующей адаптацией к условиям *ex vitro*.

*Объекты и методы исследования*

Объектом исследования служили черенки *S. sempervirens*, заготовленные с дерева (возраст – 11 лет, инвентарный номер – 2015.10612 01), произрастающего в оранжерее на территории Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (Москва), с ноября по декабрь 2022 г, с побегов 1-го года вегетации из нижнего яруса.

Первичные экспланты перед введением в культуру *in vitro* подвергали стерилизации. Для этого черенки промывали в слабом растворе перманганата калия в течение 5 мин, затем споласкивали проточной водой. После этого в условиях ламинар-бокса черенки обрабатывали стерилизующими веществами – 0,1%-м раствором хлорида ртути (экспозиция воздействия составила 15–20 мин) и 7%-м раствором гипохлорита натрия (15 мин). После этого экспланты 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге для удаления лишней влаги. Затем все черенки выдерживали в 0,2%-м растворе индолил-3-масляной кислоты (ИМК) в течение 2 ч, разрезали скальпелем на сегменты длиной до 2 см с сохранением хвои и помещали вертикально в биологические пробирки на агаризованную безгормональную питательную среду Мурасига и Скуга (MS) или Woody plant medium (WPM) [25, 28], в качестве антиоксидантного компонента добавляли 1 г/л поливинилпирролидона. рН питательной среды во всех вариантах составлял 5,8. Пробирки помещали в световую комнату на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы, интенсивность – 150 мкмоль/м<sup>2</sup>·с и выращивали при температуре 23 ± 1 °С и 16-часовом фотопериоде. После 2 циклов культивирования (каждый цикл по 35–40 сут.) сформировавшиеся микропобеги переносили на питательную среду с тождественным минеральным составом, дополненную различными гормонами с ауксиновой и цитокиновой активностью. В работе изучали влияние 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП), нафталин- и индолилуксусной кислот (НУК и ИУК соответственно), N6-(дельта-2-изопентенил)-аденина (2iP), ИМК в различных концентрациях и сочетаниях:

- 1) MS без гормонов;
- 2) ½ минеральных солей по MS без гормонов;
- 3) MS + 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л БАП;
- 4) MS + 2,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП;
- 5) MS + 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP;
- 6) MS + 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК;
- 7) MS + 3 мг/л ИУК;
- 8) WPM без гормонов.

Все вещества являются продуктами производства немецкой фирмы Merck.

Пересадку культуры осуществляли каждые 5–6 нед., при этом учитывали биометрические и морфологические показатели сформировавшихся микропобегов: количество побегов (шт.), их длину (см), количество адвентивных почек (шт.), ризогенез (%), шт.), коэффициент размножения (произведение количества побегов/эксплантов) рассчитывали согласно общепринятой методике [3].

Сформировавшиеся клоны секвойи вечнозеленой переносили в условия *ex vitro* для адаптации. Использовали почвенный субстрат (садовая земля, песок, перлит – 1:1:1). Клоны помещали в контейнеры вместимостью 0,5 л, за-

полненные увлажненным почвенным субстратом, и накрывали прозрачным «колпаком» из полиэтилена для предотвращения хаотичной транспирации и обезвоживания побегов. Контейнеры с клонами размещали в гроу-боксах, в которых поддерживали температуру 22 °С, 16-часовой фотопериод и освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 150 мкмоль/м<sup>2</sup>·с. После 2–3 нед. полиэтиленовое укрытие снимали и продолжали выращивать растения-регенеранты в гроу-боксах с сохранением влажности воздуха не менее 85–90 %.

Выполняли 20 биологических и 2–3 аналитические повторности. Средние показатели рассчитаны с использованием Microsoft Office Excel (Microsoft, США). В таблице и на диаграммах представлены средние арифметические значения и доверительные интервалы.

### *Результаты исследования и их обсуждение*

Установлено, что наибольший выход стерильных эксплантов (более 80 %) был получен при временной экспозиции воздействия хлорида ртути на черенки секвойи вечнозеленой 18 мин. В этом варианте на 20–30-е сутки культивирования отмечалось формирование из спящих почек побегов, которые характеризовались активным ростом и имели ярко-зеленую хвою. Увеличение экспозиции воздействия хлорида ртути до 20 мин приводило к формированию стерильных эксплантов, часть из которых (40 %) была нежизнеспособна.

Использование гипохлорита натрия в качестве стерилизатора оказалось неэффективно из-за низкой жизнеспособности эксплантов и образования по всей поверхности черенков некротических очагов (табл. 1).

Таблица 1

### **Влияние стерилизующих агентов на получение асептической культуры черенков секвойи вечнозеленой** **Effect of sterilizing agents on the establishment of an aseptic culture in evergreen redwood cuttings**

Стерилизатор	Концентрация, %, w/v	Продолжительность воздействия, мин	Стерильные черенки, %	Зараженные черенки, %	Примечание
Гипохлорит натрия	7,0	15	28,4±1,4	71,6±3,1	Низкая жизнеспособность эксплантов, повсеместные некротические очаги
Хлорид ртути (II)	0,1	15	30,6±1,4	69,4±3,1	После 5–7 дн. культивирования эксплантов наблюдается выход внутритканевой инфекции
		18	82,1±3,3	17,9±1,2	15 % стерильных эксплантов нежизнеспособны
		20	91,1±3,8	8,9±0,7	Более 40 % стерильных эксплантов нежизнеспособны

Успех клонального микроразмножения зависит от различных факторов, в частности, от минерального и гормонального составов питательной среды [3, 5]. Минеральный состав питательной среды (минеральные соли по MS и WPM) оказал существенное влияние на морфогенетический потенциал первичных микрочеренков (табл. 2). Среда MS отличается высокой концентраци-

ей неорганических солей, сбалансированный состав которых позволяет удовлетворять при культивировании потребности различных типов растительных тканей. Напротив, в среде WPM содержание неорганических солей ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ниже, чем в среде MS, либо они отсутствуют ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ), что обеспечивает более подходящие условия для роста тканей древесных растений.

Таблица 2

**Влияние минерального состава питательной среды на биометрические показатели побегов и коэффициент размножения секвойи вечнозеленой**  
**Effect of nutrient medium mineral composition on shoot biometrics and multiplication rate of evergreen redwood**

Питательная среда	Коэффициент размножения	Средняя длина побегов, см
MS	9,4±1,2	12,5±2,1
WPM	1,3±0,2	7,3±1,1

Визуальные наблюдения показали, что на среде MS, как правило, формировались побеги правильной морфологии (рис. 1, а), в то время как на среде WPM отмечалось образование дедифференцированных клеток в базальной части микрочеренков, которые быстро делились с формированием рыхлой каллусной ткани. Это приводило к ингибированию роста апикальной меристемы и затрудняло процесс развития микропобегов. Однако в единичных случаях из апикальных меристем формировались микропобеги, которые характеризовались медленным ростом и низким коэффициентом размножения. Кроме того, в этом варианте наблюдалась витрификация вновь сформировавшихся микропобегов с одновременной некротизацией хвои (рис. 1, б, в). Вероятно, сформировавшаяся каллусная ткань, которая состояла из крупных, оводненных, слабо лигнифицированных клеток и имела увеличенные межклеточные пространства, обуславливает большее поглощение воды из питательной среды из-за уменьшения давления клеточной стенки.

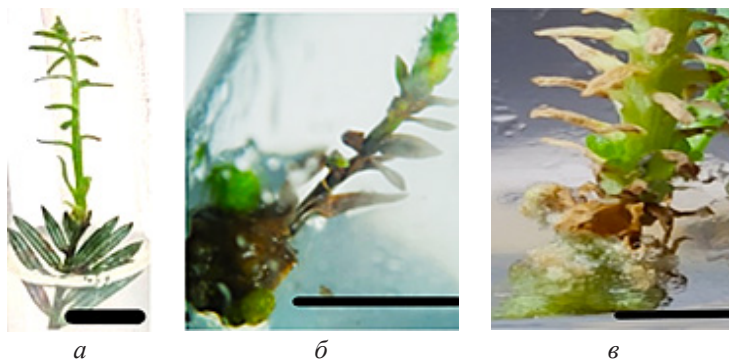


Рис. 1. Побег секвойи вечнозеленой: а – рост меристемы и формирование микропобега на питательной среде MS *in vitro*; б – формирование каллусной ткани на среде WPM; в – витрифицированные микропобеги на среде WPM (шкала измерений: а, б – 1 см; в – 0,5 см)

Fig. 1. *Sequoia sempervirens in vitro* culture: а – meristem growth and microshoot formation on MS medium; б – callus tissue formation on WPM medium; в – itrified microshoots on WPM medium. Scale bars: а, б – 1 cm; в – 0.5 cm

Полученные результаты согласуются с данными по итогам работ других исследователей, которые отмечали формирование витрифицированных побегов

на питательной среде WPM [7]. О преимуществе питательной среды с минеральным составом по прописи MS свидетельствуют исследования размножения в культуре *in vitro* некоторых редких и реликтовых хвойных растений, таких как *Taxus chinensis*, *T. brevifolia*, *T. wallichiana*, *Sequoiadendron* и др.: показаны индукция образования адвентивных почек, формирование микропобегов с последующим укоренением [29, 34].

При разработке технологии клонального микроразмножения растений необходимо учитывать не только состав питательной среды, но и происхождение экспланта, в частности, с какой части (верхняя, средняя, нижняя) микропобегов был взят микрочеренок.

С целью исключения влияния фитогормонов на ростовые и морфо-физиологические характеристики микрочеренков, полученных из различных частей микропобегов, все работы проводили на безгормональной питательной среде MS.

Наилучшими ростовыми характеристиками обладали микрочеренки из верхней части микропобегов, а микрочеренки, изолированные из нижней части, уступали по темпам роста (рис. 2). Причем эта закономерность начинала проявляться уже на 15-е сутки с начала культивирования и сохранялась на протяжении всего цикла выращивания (35 сут.).

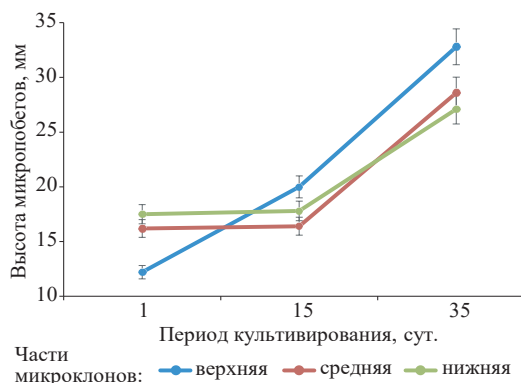


Рис. 2. Влияние происхождения микрочеренков на высоту сформировавшихся микропобегов секвойи вечнозеленой

Fig. 2. Effect of explant origin on the height of *Sequoia sempervirens* microshoots

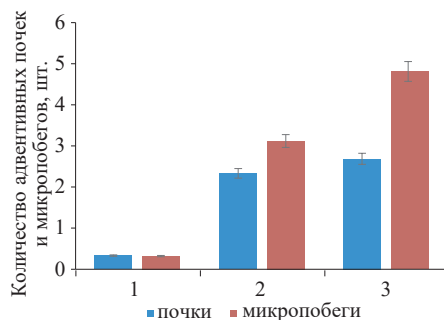
Анализ эффективности образования адвентивных почек с последующим развитием из них микропобегов демонстрирует влияние происхождения микрочеренков (верхняя, средняя, нижняя часть микропобега) на этот процесс. Установлено, что наибольшим потенциалом образовать адвентивные почки обладали микрочеренки, изолированные с нижних частей микропобегов (в среднем 5 шт. на микрочеренок), а наименьшим – микрочеренки с верхних частей клонов (в среднем 0,3 шт. на микрочеренок) (рис. 3). Полученные результаты достоверны на 5%-м уровне значимости. Вероятно, такая ответная реакция обусловлена неравномерным распределением эндогенных питательных веществ по микропобегам при выращивании.

На следующем этапе клонального микроразмножения необходимо установить оптимальные условия, обеспечивающие не только высокий коэффициент размножения, но и быстрое формирование микропобегов. Для этого в питательную среду, как правило, добавляют гормоны с ауксиновой и цитокининовой активностью. В работе использовали микрочеренки длиной 2–3 см, изолированные с верхней части микропобегов, для культивирования на питательной среде MS, дополненной различным сочетанием гормонов. Данная среда была выбрана на основании ранее проведенных нами исследова-

ний с доказательством эффективности ее применения для культивирования *S. sempervirens in vitro*.

Рис. 3. Зависимость образования адвентивных почек и микропобегов от зоны происхождения микрочеренков секвойи вечнозеленой (1–3 – верхняя, средняя и нижняя части микроклонов соответственно)

Fig. 3. Relationship between the formation of adventitious buds/microshoots and the origin zone of *Sequoia sempervirens* microcuttings (1–3 – upper, middle, and lower parts of microclones, respectively)



Установлено, что гормональный состав питательной среды оказывает существенное влияние на индукцию образования адвентивных почек (рис. 4, табл. 3), что коррелирует с коэффициентом размножения. Наибольший коэффициент размножения (12,6–17,2) был отмечен на питательных средах MS при следующих сочетаниях гормонов: 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК; 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP; 2,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП. Такой показатель в 6–8 раз превышал контрольный вариант. Полученные результаты достоверны на 5%-м уровне значимости. В этих же условиях культивирования наблюдали высокую способность микропобегов к укоренению. Причем наилучшие результаты по коэффициенту размножения были отмечены для среды, дополненной 2iP. Эти данные согласуются с информацией других авторов. Так, например, в работах Е. Asensio с соавт. показано, что замена цитокинина БАП на 2iP также способствовала повышению коэффициента размножения у растений *Thymus × josephi-angeli* [10].

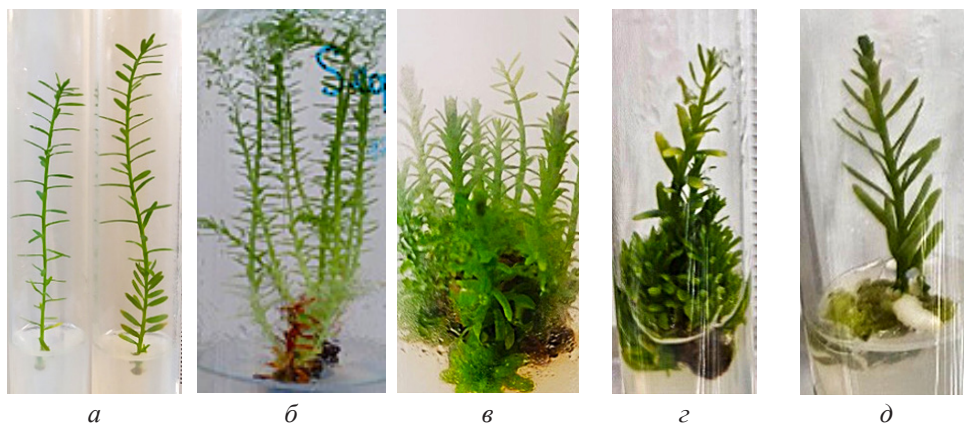


Рис. 4. Микропобеги секвойи вечнозеленой, полученные на разных питательных средах MS: а – без гормонов; б – с добавлением 2,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП; в – с добавлением 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК; г – с добавлением 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP; д – с добавлением 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л БАП (наблюдения выполнены в конце цикла выращивания – 40-е сутки)

Fig. 4. *Sequoia sempervirens* microshoots cultured on different MS media formulations: а – hormone-free; б – supplemented with 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP; в – with 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA; г – with 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 2iP; д – with 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP. Observations were made at the end of the 40-day growth cycle

Таблица 3

**Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения и укоренение микропобегов секвойи вечнозеленой на питательной среде MS**  
**Effect of growth regulators on the multiplication rate and rooting of *Sequoia sempervirens* microshoots on MS medium**

Питательная среда	Коэффициент размножения	Образование адвентивных почек на одном побеге, шт.	Средняя длина побега, см	Доля растений с корнями, %	Среднее число корней, шт.
Без гормонов	2,2±0,1	3,7±0,1	7,8±0,2	20,6±1,1	1,3±0,1
½ минеральных солей, без гормонов	1,3±0,1	2,1±0,1	5,5±0,2	0	0
2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л БАП	6,4±0,1	7,2±0,2	5,2±0,2	37±1,6	14,4±0,3
2,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП	12,6±0,1	8,2±0,2	3,5±0,1	60,3±2,8	5,8±0,2
2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP	17,2±0,3	14,1±0,3	4,8±0,2	52,7±2,4	12,7±0,3
2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК	14,8±0,3	8,6±0,2	3,8±0,1	70,4±2,9	2,1±0,1
3 мг/л ИУК	1,9±0,1	1,3±0,1	2,9±0,1	0	0

Культивирование микропобегов на безгормональной питательной среде, содержащей полный или половинный состав минеральных солей по MS, не способствовало высокой эффективности укоренения микроклонов. В нашем случае уменьшение минеральных компонентов до ½ от нормы минеральных солей (MS) не приводило к удлинению микропобегов. Хотя в работах по культивированию побегов, изолированных с 90-летних растений секвойи вечнозеленой, на питательной среде, содержащей ½ минеральных солей по прописи MS, такой состав обеспечивал элонгацию побегов [11].

Кроме того, следует отметить, что в этих вариантах, а также в варианте питательной среды с 2,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л БАП наблюдали одновременно формирование каллусной ткани в базальной части главного побега и массовое образование адвентивных почек, которые в процессе культивирования развивались в побеги, а образование корней происходило через каллусную ткань (рис. 5).

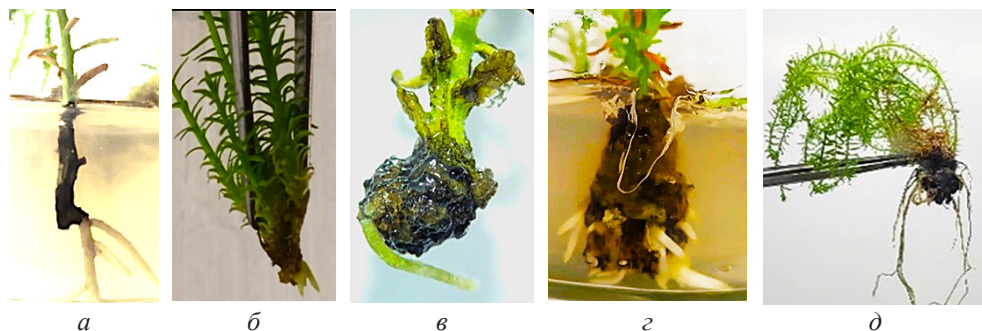


Рис. 5. Укоренение микропобегов секвойи вечнозеленой на питательных средах MS разного гормонального состава: а – без гормонов; б – с добавлением гормонов 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л БАП; в – 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК; г – 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP; д – 2,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП

Fig. 5. Rooting of *Sequoia sempervirens* microshoots on MS media with different hormonal compositions: а – without hormones; б – supplemented with 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP; в – with 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA; г – with 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 2iP; д – with 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP

В исследуемом варианте питательной среды MS без добавления гормонов также наблюдали ризогенез, но с меньшей интенсивностью. Экспериментально показано, что в большинстве вариантов формирование корней происходило также через каллусную ткань, либо в редких случаях непосредственно из нижней части микрочеренка. В этих вариантах коэффициент размножения составил от 5 до 17 в зависимости от гормонального состава питательной среды, а наилучшая частота укоренения достигала 70 % в варианте питательной среды, дополненной 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК. Применение питательной среды, содержащей только ауксин (3 мг/л ИУК) не приводило к индукции образования корней, но стимулировало формирование каллусной ткани в базальной части микропобегов.

Полученные на предлагаемых типах питательных сред растения-регенеранты секвойи вечнозеленой с хорошо развитой корневой системой в дальнейшем переносили в условия *ex vitro*. Установлено, что описанные в этой статье состав субстрата и методика адаптации способствовали приживаемости клонов в нестерильных условиях в 87,5 % случаев. В ходе изучения эффективности адаптации растений к почвенным условиям выявлено, что критическим фактором является соблюдение условий увлажнения почвенного субстрата и поддержание влажности воздуха не менее 85 %. После 5 мес. выращивания в почве растения достигали высоты 26–30 см и имели хорошо выраженный рост боковых побегов (рис. 6).



Рис. 6. Клоны секвойи вечнозеленой после пересадки в почвенный субстрат:  
а – через 3 нед.; б – через 2 мес.; в – через 5 мес.

Fig. 6. *Sequoia sempervirens* clones after transplantation to soil substrate:  
а – at 3 weeks; б – at 2 months; в – at 5 months

Согласно данным исследований [39], касающихся вопросов естественного возобновления растений секвойи, в течение 1-го года прирост поросли секвойи составляет менее 1 м. Если сравнивать ростовые характеристики растений в условиях *ex vitro* с темпами роста поросли в природном ареале, то они несколько уступают последним. Однако следует принимать во внимание такие факторы, как ограниченность объема почвенного субстрата и искусственное освещение, а также отсутствие туманов.

## Заключение

В результате проведенных исследований разработан эффективный метод клонального микроразмножения секвойи вечнозеленой *Sequoia sempervirens* (D. Don), включающий предварительную обработку черенков 0,2%-м раствором ИМК, ступенчатую стерилизацию, культивирование сегментов черенков на безгормональной питательной среде MS с последующим выращиванием на среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК или 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 2iP для размножения и 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК для укоренения. Полученные нами клоны могут быть использованы для реинтродукции секвойи вечнозеленой в естественные места произрастания, расширения коллекций ботанических садов и переноса в подходящие по метеорологическим показателям природные зоны России в качестве ценной реликтовой древесной хвойной породы, устойчивой к патогенам.

Кроме того, разработанный способ ускоренного размножения растений секвойи вечнозеленой *in vitro* возможно применять для массового получения качественного и гомогенного посадочного материала редких и реликтовых хвойных растений, в частности, секвойи гигантской, секвойи прибрежной и метасеквойи глиптостробовидной, которая находится на грани полного вымирания и занесена в Международную Красную книгу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Болотина Е.А., Зайцева С.М., Голиванов Я.Ю., Тацкий Г.Р., Бисембаев Т.Н. Агробактериальная трансформация микроклонов *Sequoia sempervirens* (D. Don) endl. Геном GFP // Тез. докл. XII Междунар. науч. конф. молодых ученых. М., 2024. С. 78–82.  
Bolotina E.A., Zaytseva S.M., Golovanov Ya.Yu., Tatsiy G.R., Bisembaev T.N. Agrobacterial Transformation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Microclones Endl. The GFP Genome. *Proceedings of the XII International Scientific Conference of Young Scientists*. Moscow, 2024, pp. 78–82. (In Russ.).
2. Зайцева С.М., Калашикова Е.А., Киракосян Р.Н. Влияние эндогенных полифенолов, фотопериода и минерального состава питательной среды на формирование каллусной ткани реликтовых голосеменных растений *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. // Вopr. биологич., фармацевтич. и медицинск. хим. 2023. № 3(26). С. 46–57.  
Zaytseva S.M., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. The Influence of Endogenous Polyphenols, Photoperiod and Mineral Composition of the Nutrient Medium on the Formation of Callus Tissue of Relict Gymnosperms *Sequoia sempervirens*. *Voprosy Biologicheskoy, Farmatsevticheskoy i Meditsinskoy Khimii* = Questions of Biological, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, 2023, no. 3(26), pp. 46–57. (In Russ.).  
<https://doi.org/10.29296/25877313-2023-03-06>
3. Калашикова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М., Карсункина Н.П., Халилуев М.Р., Хлебникова Д.А., Поливанова О.Б., Лобанова В.А. Основы биотехнологии. Практикум. М., 2023, 160 с.  
Kalashnikova E.A., Cherednichenko M.Yu., Kirakosyan R.N., Zaytseva S.M., Korsunkina N.P., Khaliluyev M.R., Khlebnikova D.A., Polivanova O.B., Lobanova V.A. Fundamentals of Biotechnology. Practical work. Moscow, 2023. 160 p. (In Russ.).
4. Коровин В.В., Курнос Г.А. Капы // Вестн. МГУЛ – Лесн. вестн. 2000. № 4. С. 29–34.  
Korovin V.V., Kurnosov G.A. Kapу. *Lesnoy vestnik* = Forestry Bulletin, 2000, no. 4, pp. 29–34. (In Russ.).

5. Султонова М.С. Особенности микроклонального размножения и органогенез некоторых представителей хвойных пород (*Sequoiadendron giganteum* Lindl и *Biota orientalis* L.): автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2016. 24 с.

Sultanova M.S. *Features of Microclonal Reproduction and Organogenesis of Some Representatives of Coniferous Species (Sequoiadendron giganteum Lindl. and Biota orientalis L.)*: Cand. Agric. Sci. Abs. St. Petersburg, 2016. 24 p. (In Russ.).

6. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Лукина А.С. Образование каллуса и индукция соматических зародышей в культуре *in vitro* у *Pinus sibirica* Du Tour // Журн. СФУ. Сер.: Биология. 2013. Т. 6, № 1. С. 44–60.

Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N., Lukina A.S. Callus Formation and Induction of Somatic Embryos, in *in vitro* Culture in *Pinus sibirica* Du Tour. *Zhurnal SFU = SibFU Journal. Biology*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 44–60. (In Russ.).

7. Филиппова И.П. Витрификация у эксплантов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в культуре *in vitro* // Вестн. Красноярск. гос. аграрн. ун-та. 2009. № 8. С. 85–88.

Filippova I.P. Vitrification in Explants of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in *in vitro* Culture. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universitetata = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University*, 2009, no. 8, pp. 85–88. (In Russ.).

8. Abbasin Z., Zamani S., Movahedi S., Khaksar G., Sayed Tabatabaei B.E. *In vitro* Micropropagation of Yew (*Taxus baccata*) and Production of Plantlets. *Biotechnology*, 2010, no. 9, pp. 48–54. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.48.54>

9. Ahuja M.R. Strategies for Conservation of Germplasm in Endemic Redwoods in the Face of Climate Change: A Review. *Plant Genetic Resources*, 2011, no. 9(03), pp. 411–422. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000153>

10. Asensio E., de Medinacelli Juan-Méndez R., Juan-Vicedo J. *In vitro* Propagation and Phytochemistry of Thymol-Producing Plants From a Horticultural Form of *Thymus × josephi-angeli* Mansanet & Aguil. (Lamiaceae). *Horticulturae*, 2022, no. 8, p. 1188. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121188>

11. Balogh B., Anderson A.B. Chemistry of the Genus Sequoia – II: Isolation of Sequirins, New Phenolic Compounds from the Coast Redwood (*Sequoia sempervirens*). *Phytochemistry*, 1965, vol. 4, iss. 4, pp. 569–575. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86218-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86218-4)

12. Bon M-C., Riccardi F., Monteuis O. Influence of Phase Change Within a 90-Year-Old *Sequoia sempervirens* on Its *in vitro* Organogenic Capacity and Protein Patterns. *Trees*, 1994, no. 8, pp. 283–287. <https://doi.org/10.1007/BF00202672>

13. Brown P.M. OLDLIST: A Database of Maximum Tree Ages. Radiocarbon. *Tree Rings, Environment, and Humanity*. Eds. J.S. Dean, D.M. Meko, T.W. Swetnam. The University of Arizona, Tucson, 1996, pp. 727–731.

14. Carroll A.L., Sillett S.C., Kramer R.D. Millennium-Scale Crossdating and Inter-Annual Climate Sensitivities of Standing California Redwoods. *Plos One*, 2014, no. 9(7), e102545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102545>

15. Christian T. *Sequoiadendron Giganteum*. From the Website Trees and Shrubs Online. Available at: <https://www.treesandshrubsonline.org/articles/sequoiadendron/sequoiadendron-giganteum/> (accessed 21.06.25).

16. Clark J.W. Natural Decay Resistance of the Heartwood of Coast Redwood *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Forest Products Journal*, 1983, vol. 33, no. 5, pp. 15–20.

17. Disney M., Burt A., Wilkes P., Armston J., Duncanson L. New 3D Measurements of Large Redwood Trees for Biomass and Structure. *Scientific Reports*, 2020, no. 10, art. no. 16721.

18. Douhovnikoff V., Dodd R.S. Intra-Clonal Variation and a Similarity Threshold for Identification of Clones: Application to *Salix exigua* Using AFLP Molecular Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, no. 106, pp. 1307–1315.

<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1200-9>

19. Eckert Christopher G. The Loss of Sex in Clonal Plants. *Ecology and Evolutionary Biology of Clonal Plants: Proceedings of Clone-2000. An International Workshop Held in Obergurgl*. Springer Netherlands, 2002, pp. 279–298.
20. El-Hawary S.S., Abd El-Kader E.M., Rabeh M.A., Abdel Jaleel G.A., Arafat M.A., Schirmeister T., Abdelmohsen U.R. Eliciting Callus Culture for Production of Hepatoprotective Flavonoids and Phenolics from *Sequoia sempervirens* (D. Don Endl). *Nat Prod Res*, 2020, no. 34(21), pp. 3125–3129. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1607334>
21. Francis E., Asner G.P., Mach K.J., Field C.B. Landscape Scale Variation in the Hydrological Niche of California Coast Redwood. *Ecography*, 2020, no. 43, pp. 1305–1315. <https://doi.org/10.1111/ecog.05080>
22. Hall G.D., Langenheim J.H. Temporal Changes in the Leaf Monoterpenes of *Sequoia sempervirens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1986, vol. 14, no. 1, pp. 61–69. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(86\)90086-4](https://doi.org/10.1016/0305-1978(86)90086-4)
23. Ishii H.T., Jennings G.M., Sillett S.C., Koch G.W. Hydrostatic Constraints on Morphological Exploitation of Light in Tall *Sequoia sempervirens* Trees, *Oecologia*, 2008, vol. 156, pp. 751–763. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1032-z>
24. Kirakosyan R.N., Kalasnikova E.A., Bolotina E.A., Saleh A., Balakina A.A., Zaytseva S.M. Localization of Secondary Metabolites in Relict Gymnosperms of the Genus *Sequoia in vivo* and in Cell Cultures *in vitro*, and the Biological Activity of Their Extracts. *Life*, 2024, no. 14, p. 1694. <https://doi.org/10.3390/life14121694>
25. McCown B.H., Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) – A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 1981, no. 16, pp. 453–453.
26. Mihaljevic S. Root Formation in Micropropagated Shoots of *Sequoia sempervirens* Using Agrobacterium. *Plant science*, 1999, vol. 141, no. 1, pp. 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00223-4)
27. Moraes C., Navroski M.C., de Oliveira Pereira M., de Oliveira L.M., Miranda I.A., Nascimento B., Angelo A.C., Nicoletti M.F., Mantovani A., Pereira da Silva Filho D. Seed Quality and Seedling Production of *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, and *Pseudotsuga menziesii*. *Forests*, 2025, no. 16(2), p. 352. <https://doi.org/10.3390/fl6020352>
28. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
29. Nydick K.R., Stephenson N.L., Ambrose A.R., Asner G.P., Baxter W.L., Das A.J., Dawson T., Martin R.E., Paz-Kagan T. Leaf to Landscape Responses of Giant *Sequoia* to Hotter Drought: An Introduction and Synthesis for the Special Section. *Forest Ecology and Management*, 2018, vol. 419, pp. 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.03.028>
30. O'Hara K.L., Berrill J.P. Epicormic Sprout Development in Pruned Coast Redwood: Pruning Severity, Genotype, and Sprouting Characteristics. *Annals of Forest Science*, 2009, vol. 66, p. 409. <https://doi.org/10.1051/forest/2009015>
31. Hartesveldt R.J., Harvey T.H., Shellhammer H.S., Stecker R.D. *Sequoias'* Dependence on Fire. *Science*, 1969, vol. 166, iss. 3905, pp. 552–553. <https://doi.org/10.1126/science.166.3905.552.b>
32. Rogers D.L. *Spatial patterns of allozyme variation and clonal structure in Coast redwood (Sequoia sempervirens)*. University of California, Berkeley, 1994. 342 p.
33. Sârbu A., Cogalniceanu G., Smarandache D., Pascale G. Morpho-Anatomical Studies on Vegetative Organs of *Sequoia sempervirens*, *in vitro* Culture on Carbon Microstructure Substrates. *Acta Horti Botanici Bucurestiensis*, 2008, no. 35, pp. 51–59.
34. Sillett S.C. et al. How Do Tree Structure and Old Age Affect Growth Potential of California Redwoods? *Ecological Monographs*, 2015, vol. 85, iss. 2, pp. 181–212. <https://doi.org/10.1890/14-1016.1>

35. Sillett S.C., Antoine M.E., Carroll A.L., Graham M.E., Chin A.R., Van Pelt R. Rangelwide Climatic Sensitivities and Non-Timber Values of Tall *Sequoia sempervirens* Forests. *Forest Ecology and Management*, 2022, vol. 526, 120573.

<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120573>

36. Sillett S.C., Van Pelt R. Trunk Reiteration Promotes Epiphytes and Water Storage in an Old-Growth Redwood Forest Canopy. *Ecological Monographs*, 2007, no. 77(3), pp. 335–359. <https://doi.org/10.1890/06-0994.1>

37. Biblin S., Russell W., Wilkin K. Long-Term Influence of Prescribed Burning on Subsequent Wildfire in an Old-Growth Coast Redwood Forest. *Fire Ecology*, 2025, vol. 21, no. 11. <https://doi.org/10.1186/s42408-025-00356-5>

38. Thomas H.H., Shellhammer H.S., Stecker R.S. *National Park Service Giant Sequoia Ecology*. U.S. Department of the Interior, National Park Service, 1980. 182 p.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest