

УДК 581.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯВЛЕНИЯ РЕЮВЕНИЛИЗАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЕГЕТАТИВНОГО ПОТОМСТВА ДРЕВЕСНЫХ

© 2024 г. В. Н. Шмаков^{a,*}, В. И. Бельков^{a, b}, Ю. М. Константинов^{a, b}

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Иркутский государственный университет”, Иркутск, Россия

*e-mail: vladwork70@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Вегетативное размножение обеспечивает возможность масштабирования ценного растительного материала в наиболее короткие сроки. Особую важность оно приобретает при разведении древесных культур с сохранением ценных биологических и морфологических сортовых особенностей отдельных особей. Использование такого подхода позволяет быстро размножать особо ценные произрастающие в парках и лесах растения, в то время как при семенном воспроизводстве не сохраняются их ценные наследственные признаки. В связи с этим создание и совершенствование надежных способов вегетативного размножения древесных видов не теряет своей актуальности. Как известно, вегетативное размножение деревьев достигается в ювенильной фазе развития, а не на стадии зрелости, что сильно ограничивает использование этого подхода. Такая ситуация может быть преодолена путем применения технологий, основанных на активном использовании реювенилизации — явления, биологическая природа которого на сегодняшний день остается недостаточно изученной. Тем не менее, накоплен значительный исследовательский опыт инициации реювенилизации, т.е. проведения процедур искусственного возвращения взрослых растений или отдельных их частей в юное состояние. В настоящей статье приводится обзор технологий, позволяющих реализовать процесс переключения стратегии развития растения с фазы зрелости к ювенильному состоянию. К ним относятся культивирование меристем, химическая обработка растительного материала, сильная обрезка и хеджирование, использование корневых отпрысков и коппинг, инициация развития пазушных и эпикормических почек, прививка и микропрививка, повторное субкультивирование, а также соматический эмбриогенез. Для дальнейшего успешного развития этого направления требуется применение комплексного подхода, основанного на совокупности омиксных технологий и методов молекулярной генетики, молекулярной и клеточной биологии.

Ключевые слова: вегетативное размножение, древесные виды, искусственные методы, лес, реювенилизация (омоложение)

DOI: 10.31857/S0015330324060032, EDN: MAWCHU

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность искусственного лесоразведения и лесовосстановления

С древних времен деревья сопровождают жизнь человека и являются возобновляемыми источниками пищевых ресурсов, кормов,

топлива, волокон, строительного материала и другого хозяйственно ценного сырья [1]. Общепризнано, что деревья составляют неотъемлемую часть лесных сообществ. Леса же, в свою очередь, являются важнейшим ресурсом для достижения целей в области устойчивого развития, разработанных в 2015 г. Генеральной ассамблеей ООН в качестве “плана достижения лучшего и более устойчивого будущего для всех”, связанных с устойчивым производством и потреблением, борьбой с бедностью, продовольственной безопасностью, сохранением биоразнообразия и изменениями климата [2].

Сокращения: SAM — апикальные меристемы побегов; ОС — организационный центр; IBA — индол-3-масляная кислота; BA — 6-бензиладенин; KN — кинетин; CPPU — N-(2-хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевина; Zip — 2-изопентениладенин; TDZ — тиadiaзурон; Z — зеатин; AGP — водорастворимые арабиногалактановые белки.

При этом все возрастающие потребности человечества в древесине и продуктах ее переработки, а также изменяющиеся климатические условия на планете привели к тому, что лесной покров Земли неуклонно, хотя и с тенденцией к замедлению, но сокращается. Уменьшение площади лесов, угроза сохранению их биоразнообразия в конечном итоге может привести к снижению качества жизни людей. Поэтому все более актуальной становится потребность в сохранении древесных экосистем, как с точки зрения их экологической, так и эстетической ценности. Для поддержания лесного фонда широко используются традиционные подходы к созданию, размножению и улучшению плантационных и других лесных культур. Однако такие методы ограничены несколькими присущими им узкими местами, поскольку деревья, как правило, являются медленно растущими, долгоживущими, сексуально несовместимыми и сильно гетерозиготными растениями. Из-за преобладания высокой гетерозиготности у этих видов в популяциях сохраняется ряд рецессивных вредных аллелей, что приводит к высокой генетической нагрузке и депрессии инбридинга [1]. Традиционно восстановление большинства лесных древесных видов на специально отведенных площадях основано на их размножении семенами. Но семенные сады (плантации) имеют ограничения: не все родительские формы вносят свой вклад в семенной ассортимент, некоторые семена являются результатом самоопыления, что приводит к появлению слабого (некондиционного) потомства, пыльца низкого качества может попадать из-за пределов сада (плантации). Возможна также отрицательная корреляция между фертильностью и вегетативным ростом [3]. В частности, что касается хвойных, они часто хорошо цветут только с интервалом в несколько лет, в нерегулярном цикле [4]. Как следствие, семенной материал, полученный из семенных садов (плантаций) в результате контролируемого опыления, доступен не каждый год и часто только в малых количествах. Это, в свою очередь, ограничивает использование традиционных методов селекции, таких как самоопыление и обратное скрещивание, и затрудняет поддержание желаемых аллелей в определенном генетическом фоне [5]. Традиционная селекция довольно медленна и низкопродуктивна, и ее нельзя эффективно использовать для генетического улучшения деревьев. Чтобы обойти эти препятствия, на смену традиционным методам пришло вегетативное клональное размножение. Оно более пригодно для отбора, сохранения и восстановления доминантных, аддитивных и эпистатических генетических эффектов перспективных генотипов [1].

Вегетативное размножение

Вегетативное размножение, в частности, микроразмножение древесных пород предлагает быстрые средства производства клонального посадочного материала для программ лесоразведения, производства древесной биомассы и сохранения элитного и редкого материала в виде зародышевой плазмы. Все более широко обсуждается идея плантационного клонального лесоводства в сочетании с традиционными программами селекции для удовлетворения растущего спроса на древесину в течение следующих нескольких десятилетий [1, 6].

В настоящее время имеется много способов вегетативного размножения. В первую очередь это традиционные хорошо себя зарекомендовавшие методы размножения с помощью видоизмененных побегов (клубни, луковичы, корневища, усы-столоны), частями вегетативных органов (стебли, листья, корни) или путем прививки (копулировка – черенками или окулировка – почками). Однако такие способы вегетативного размножения зачастую не дают возможности получать многочисленное потомство от одного дерева или его части в течение всего года, не гарантируют отсутствия вирусов в посадочном материале и сохранение характеристик родительского растения [7].

Очевидно, решить эту важную проблему можно лишь с помощью принципиально новых методов вегетативного клонального размножения, основанных на культивировании изолированных клеток, тканей и органов растений в стерильных условиях – на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* [8]. Такие способы размножения дают возможность получать посадочный материал независимо от урожая семян и наиболее полно сохранять в потомстве хозяйственно-ценные признаки и свойства материнского растения, фиксируя их генетические преимущества и позволяя произвести достаточное количество растительного материала [9]. Такое клонирование осуществляется *in vitro* с помощью прививки, укоренения черенков, микроразмножения, соматического эмбриогенеза, культуры верхушечных или пазушных почек, органогенеза через культуру каллуса или индукцию адвентивных почек [10]. Эти методы эффективны при массовом клонировании лесных древесных видов, в том числе хвойных пород, и многие из них могут привести к получению генетически улучшенного посадочного материала [11].

Основные методы клонального размножения были разработаны и апробированы на ювенильном растительном материале (зиготных зародышах, сеянцах, саженцах) [4]. Поэтому для клонального размножения часто отбирают образцы, когда они еще слишком молоды для надлежащей оценки [12].

*Проблемы вегетативного (клонального)
размножения*

Использование для клонального размножения материала от юных растений менее предпочтительно, чем применение для этих целей частей взрослых растений. Многие хозяйственно ценные характеристики растений становятся очевидными только после полового созревания организма, когда деревья уже достигли зрелости [13–15]. Полный потенциал генетического развития молодых растений менее известен, по сравнению с взрослыми деревьями [10, 15]. С практической точки зрения более интересны деревья, которые доказали свои качественные характеристики, такие как показатели роста и устойчивость в течение длительного периода времени [16]. Такая оценка часто проводится в половине ротационного возраста [12]. Но отрицательным моментом такой расширенной оценки является то, что к этому времени большинство особей утратили способность к вегетативному размножению. Более того, даже когда возможно вегетативное размножение отдельных взрослых особей, оно часто связано с невозможностью или неправильным корнеобразованием и плагиотропизмом [4, 17]. Так, у хвойных очень низкий уровень естественного укоренения — около 1–5%. Кроме того, у них очень сложно получить корнеобразование даже в случае применения стимуляторов роста [18].

Учитывая эти факты, нельзя ожидать максимальной выгоды от клонального размножения, пока не будут найдены подходящие средства либо для клонирования старых деревьев, либо для определения в молодом возрасте того, какими будут деревья в конце их ротации [12].

*Реювенилизация в решении проблемы
вегетативного размножения лесных видов*

Исходя из того, что вегетативное размножение деревьев намного проще провести тогда, когда они находятся в ювенильной фазе, чем в фазе зрелости [19], решение проблемы клонирования может осуществляться, как минимум, двумя способами. Первый — это использование в качестве эксплантов ювенильных тканей взрослых деревьев, поскольку ювенильность некоторых частей (и органов взрослых) деревьев может сохраняться в течение длительного времени [20]. Такие ткани, обладающие более высокой морфогенной способностью, расположены по всему организму растения [21]. Так, например, ювенильные признаки могут сохраняться в основании дерева (онтогенетически молодая ткань), тогда как созревание происходит на периферии растения в онтогенетически более старой, но молодой хронологически ткани [1]. Михалевской и Шабашевой [22] также описан факт

спонтанного развития побегов с ювенильной структурой не только из спящих почек в нижней части ствола дерева сосны канарской (*Pinus canariensis* C. Sm.), но и на побегах во всех частях кроны этого дерева, высота которого около 6 м. Такие побеги с ювенильными структурами вполне могут быть использованы для вегетативного размножения данного вида.

Вторая возможность решения проблемы клонирования взрослых деревьев — это стимуляция переключения развития растения со стадии зрелости к ювенильной стадии через омоложение и возврат к ювенильным характеристикам организма [23].

Ключевым моментом в омоложении растений является обращение вспять стадии развития (органов и/или тканей) взрослых или стареющих растений, возвращение их хронологического возраста до статуса ювенильности и восстановление потенциала развития молодых особей [20]. У растительных видов, в том числе деревьев, в процессе их развития отмечены фазовые изменения, которые приводят к снижению способности к вегетативному размножению, микроразмножению, а также к соматическому эмбриогенезу. При этом, изменяя условия *ex vitro* и/или *in vitro*, в которых находится исходный материал или эксплантат, зачастую можно добиться омоложения и увеличения степени размножения [10].

Омоложение растений происходит за счет перепрограммирования клеток или регулирования факторов окружающей среды. Перепрограммирование клеток, с одной стороны, потенциально достижимо путем стимуляции существующих эмбриональных стволовых клеток в растениях, используемых для получения ювенильных растений. С другой стороны, в зависимости от тотипотентности растительных клеток, дифференцированные клетки могут быть индуцированы сначала к дедифференциации с последующей новой дифференциацией и, в конечном итоге, к формированию растений-регенерантов [24]. На репродуктивную жизнеспособность также влияют факторы окружающей среды, такие как фотопериод, интенсивность света, температура и доступность воды [25]. Обращение старения (возврат к более ранним стадиям развития) может быть достигнуто с помощью различных искусственных способов, которые продемонстрировали возможность стимулировать реювенилизацию у зрелых (не ювенильных) растений, не поддающихся обычным (традиционным) методам вегетативного размножения (рис. 1) [20, 26]. Среди этих способов известна сильная обрезка (хеджирование); использование прикорневых (пневых) побегов и коппинг эпикормальных побегов и материала ювенильных частей взрослых растений; использование

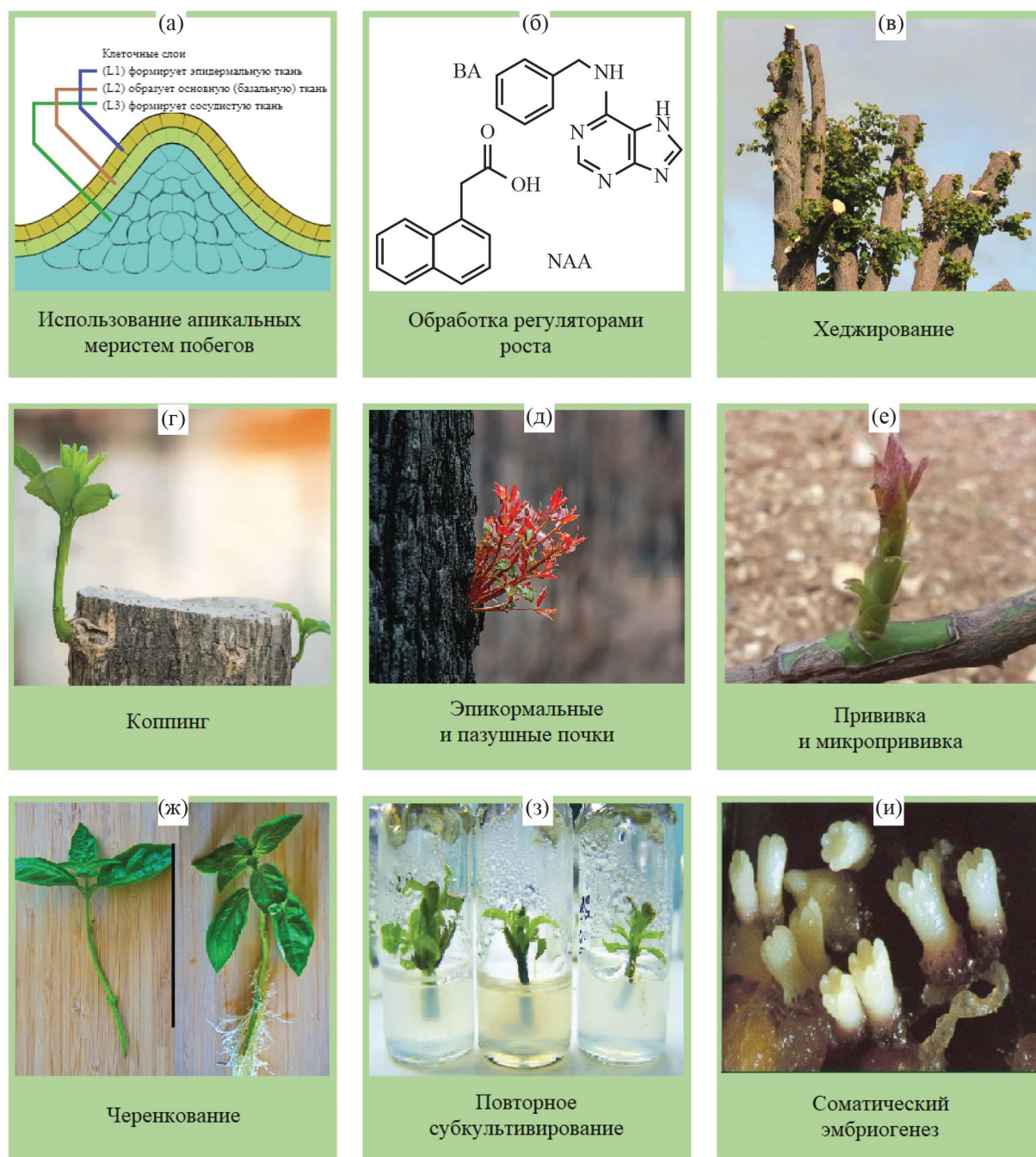


Рис. 1. Методы реювенилизации взрослого растительного материала.

(выгонка) побегов из придаточных почек; прививка взрослых черенков на молодые подвои; последовательная многократная прививка; обработка взрослых растений или их частей химическими веществами, регулирующими рост; удаление листьев со взрослых деревьев, что приводит к элиминации ингибирования процесса укоренения; использование различных методов размножения *in vitro* [27–30]. Методы *in vitro* включают в себя культивирование выбранных (тщательно отобранных) эксплантов, такие как культивирование меристем, повторное субкультивирование, микропрививка на ювениль-

ные укорененные побеги, образование адвентивных почек в культуре органов, органогенез, соматический эмбриогенез и перенос генов [1, 31]. Далее остановимся на ряде основных из перечисленных методов.

МЕТОДЫ РЕЮВЕНИЛИЗАЦИИ

1. Культивирование меристем. Использование ювенильных тканей взрослого растения

Известно, что в различных частях растительного организма всегда имеются определенные ткани и/или клетки (плюри- или тотипотент-

ные), которые в большей степени компетентны к формированию нового вегетативного растения. У лиственных деревьев и некоторых голосеменных такие ткани обнаруживаются в прикорневой зоне, а также в зонах близких к месту активного мейоза примерно в то время, когда этот мейоз происходит [21]. Другим потенциально активным участком является верхушка побега при условии удаления с него значительной части или всех зачатков листы или хвои [15]. Верхушки побегов содержат в своем составе области, отличающиеся большей морфогенетической компетентностью, чем окружающие [32]. Такие области, в основном, представлены меристемами.

Меристемы часто функционируют как автономные ткани; они поддерживают специфическую программу роста, независимую от факторов, возникающих где-либо внутри растения, или от внешних воздействий, т.е. они детерминированы [33]. Отдельные меристемы (ингибированные меристемы небольшого размера, которые обычно не образуют сосудистых соединений с остальной частью дерева) могут быть источником ювенильной ткани [12]. Такие меристемы были обнаружены у деревьев как голосеменных, так и покрытосеменных видов [34].

Для целей омоложения часто используют апикальные меристемы побегов (SAM, shoot apical meristems), в состав которых входят плюрипотентные стволовые клетки [21]. SAM представляет собой три отдельных клеточных слоя [35]. Первый (L1) формирует эпидермальную ткань, второй (L2) образует основную (базальную) ткань, а третий (L3) – сосудистую ткань (рис. 1а). Все они находятся под контролем центрального организационного центра (ОС, organizing center), который регулирует содержание небольшой популяции стволовых клеток, расположенных непосредственно над ним. Эти стволовые клетки имеют низкую скорость деления и являются поставщиками клеток в периферийную зону, где они начинают делиться быстрее, инициируя развитие клеточных линий, которые образуют различные клеточные слои. Очевидно, что маленькие, изолированные части меристемы обладают сильной регенеративной способностью. Считается, что культивирование таких небольших участков SAM *in vitro* способствует как омоложению, так и преодолению неспособности растений к микрорепродуктивному размножению [21]. Большая работа по установлению связи между использованием эксплантов мельчайших меристем и процедурой омоложения была проведена на кукурузе. Меристемы, взятые от зрелых растений кукурузы, давали начало молодому потомству, если меристема содержала зачатки одного-двух листьев, или листья

зрелого типа, в случае наличия в зоне меристемы большого количества зачатков [32].

Что касается хвойных, то было проведено несколько экспериментов с использованием изолированных меристем, которые позволили получить ювенильные растения из тканей побега зрелых особей. Так, из большого числа эксплантов апексов побегов 100-летнего дерева *Sequoiadendron giganteum* с прилежащими к экспланту только одним или двумя зачатками (примордиями) хвои, один продуцировал нормальные растения, неотличимые от тех, которые обычно получают от семян этого вида [36]. В аналогичном эксперименте с 3–7-летним *Pinus radiata* несколько меристематических куполов с двумя или тремя примордиями хвои образовывали побеги, которые были потенциально способны к укоренению [37].

Меристематическим материалом, имеющим потенциал для реювенилизации, могут быть ткани и клетки, выделенные из генеративных органов взрослых растений [38]. Наибольшее распространение с целью омоложения/размножения получило использование незрелых пыльников, что, возможно, связано с мейотическим процессом, проходящем в зоне их формирования [21]. Адвентивные побеги формировались из диплоидной соматической ткани женских стробил *Larix decidua*, при этом только в течение короткого времени, ограниченного процессом мейоза [39]. Точно так же Wang с соавт. [40] инициировали образование адвентивных побегов из срезов женских шишек *Picea abies*, собранных во время мейоза. Другие ткани цветков и соцветий, которые были использованы для регенерации растений, представляют собой неоплодотворенные яйцеклетки и нуклеолы (например, цитрусовые [41]) и семенные покровы (например, *Hevea brasiliensis* [42]).

Источником эксплантов с хорошей морфогенной активностью также может являться прокамбий, содержащий плюрипотентные сосудистые стволовые клетки [6, 43]. Прокамбий дает начало периклилу, и эта ткань также заслуживает внимания как потенциальный источник плюрипотентных или тотипотентных клеток [44]. Другие ткани в прокамбиальной области, которые обладают некоторым морфогенным потенциалом, связаны со смоляными ходами, расположенными в стеблях, хвое и зонах раневого повреждения хвойных [45]. Различные типы организованных структур возникали из смоляных каналов адвентивной хвои, полученной *in vitro* в культуре побегов нескольких видов хвойных [46]. Эпителиальные клетки смоляных каналов являются в течение короткого периода времени сильно недифференцированными по структуре, что, возможно, объясняет их морфогенный потенциал [6].

Говоря о выборе тканей и/или клеток, наиболее пригодных для использования в качестве эксплантов, следует обратить внимание также на молодые ткани корня [47].

2. Химическая или физическая обработка тканей и органов растений

2.1. Обработка стимуляторами роста растений

Обновлению растительных тканей и получению омоложенных растений может способствовать обработка этих тканей химическими веществами, в первую очередь растительными гормонами [20].

Хорошо известно, что изменения в эндогенных и экзогенных уровнях растительных гормонов являются условием реверсирования развития растений. Поскольку омоложение растений включает ремоделирование клеточной судьбы взрослых тканей, гормоны могут действовать при омоложении растений путем повторного перевода клеток на их эмбриональный и меристематический путь развития [20].

Для омоложения растительного материала используются такие регуляторы роста растений, как ауксины (NAA — нафтил-уксусная кислота; NOA — нафтоксиуксусная кислота; IAA — индол-3-уксусная кислота; IBA — индол-3-масляная кислота), цитокинины (BA — 6-бензиладенин; KN — кинетин; CPPU — N-(2-хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевина; 2ip — 2-изопентениладенин; TDZ — тиadiaзурон, Z — зеатин) [1].

Известно, что взаимодействие ауксина и цитокинина способствует регуляции образования каллуса и органогенеза в природе или в системе *in vitro* [48]. При этом и процесс микроразмножения взрослых растений может быть улучшен путем обработки взрослых деревьев цитокининами, либо отдельно, либо в сочетании с ауксинами [10].

Применение бензиладенина в культуре зрелой растительной ткани стимулирует рост боковых почек или образование адвентивных побегов [28]. При этом сам процесс образования адвентивных побегов может рассматриваться как процесс омоложения, так как все адвентивные побеги обладают ювенильными характеристиками [49]. При клональном размножении хвойных растений цитокинины использовались для “омоложения” нескольких древесных пород: BA для взрослых деревьев *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus lambertiana*, *Larix decidua*; BA и TDZ для 30-летних деревьев *L. decidua*; BA с NAA для *L. gmelinii*; Z для *Cedrus atlantica*, *C. libani*, *Picea abies*; TDZ для *Pinus pinea*, *Araucaria excelsa* [18]. А поэтапно применяя BA и NAA, удалось регене-

рировать целые растения из верхушечных побегов *Arachis hypogaea* [50].

Предполагается, что гиббереллины также влияют на омоложение, поскольку гибберелловая кислота (GA) является важным гормоном, участвующим в созревании [51]. Путем опрыскивания GA было достигнуто повторное появление ювенильных морфологических характеристик или улучшение укоренения ряда растений [12]. Так его применение (GA3) может вызвать превращение зрелых растений *Hedera* в ювенильную форму [28]. Известно, что обработка гибберелином GA4 обеспечивает переключение с инициации стволовых клеток на клеточное деление [52].

Этилен и абсцизовая кислота (АБК) играют роль в омоложении растений, вызывая появление бокового корня [53]. При этом состояние покоя у *Theobroma cacao* контролируется эндогенными уровнями АБК, а омоложение побегов контролируется эндогенными цитокининами [50]. Также известно, что абсцизовая кислота и замедлители роста могут стабилизировать зрелую форму растения [28].

2.2. Омоложение, связанное с действием стресса

Некоторые из вышеперечисленных веществ, помимо прочего, являются стрессовыми для растения агентами. При этом известно, что вызванный в тканях растения стресс оказывает на них омолаживающее действие [54]. Следовательно, стрессовое воздействие гормонов роста на клетки, в том числе, может объяснять омолаживающее действие этих веществ на растительные ткани. Этим же можно объяснить стимуляцию образования соматических эмбрионов (о соматическом эмбриогенезе как методе реювенилизации речь пойдет ниже) на апикальных ростках проростков моркови в течение 1–3 недельного стрессового воздействия на них солями тяжелых металлов (кобальт, никель, цинк, кадмий) [55]. Аналогичный эффект на формирование соматических эмбрионов оказывала обработка каллусной культуры *Acacia catechu* пролином — аминокислотой, связанной со стрессом [56].

Показано, что омоложения тканей, в том числе и инициации процесса соматического эмбриогенеза, можно добиться при использовании продуктов деградации клеточной стенки (водорастворимые арабиногалактановые белки (AGP) и связанным с патогенезом ферментом — хитиназой [57]. Например, бактериальные факторы нодуляции способствуют эмбриогенезу в суспензионной культуре моркови [58]. AGP, продуцируемые эмбриогенными культурами, часто вызывают эмбриогенез в культурах, которые обычно не эмбриогенны, даже если эмбриогенные и неэмбриогенные культуры при-

надлежат к разным видам [10]. Эти соединения действуют как антагонисты ауксина, хотя они также могут проявлять активность ауксина [57]. Хитиназа регулируется развитием интактных растений. В верхних листьях ее содержание ниже, чем в нижних листьях и корнях [59]. Хитиназы могут накапливаться *in vitro* в ответ на различные виды стресса [60, 61]. Было установлено, что гликозилированная кислая эндохитиназа с молекулярной массой 32 кДа играет важную роль в правильном раннем развитии соматических зародышей [60]. Ее основной функцией, по-видимому, является стимуляция нормального развития протодермы у ранних эмбрионов, что является важным этапом в переходе от пре-глобулярных к глобулярным соматическим зародышам [60]. Подобные механизмы перехода могут происходить во время эмбриогенеза и у хвойных. В эмбрионных культурах *Picea abies* были обнаружены два морфологически различных типа эмбрионов. Один из них (тип А) продуцирует нормальные зародыши и побеги легче, чем другой (тип В). Тип А в процессе культивирования выделяет во внешнюю среду внеклеточный белок, похожий на хитиназу. Когда на культуры типа В воздействовали внеклеточными белками, выделенными клетками типа А, эмбрионы в культурах типа В перешли на более высокую стадию развития [62].

Помимо непосредственного стрессового воздействия химическими агентами на ткани взрослых растений с целью их реювенилизации могут быть использованы и различные физические методы. Примеры стресс-стимулирующего омоложения включают повторное обрезание ветвей взрослых деревьев, коппинг, прививку, повторное укоренение черенков и другие [10].

3. Сильная обрезка и хеджирование

Хеджирование (hedging) (рис. 1в), т.е. регулярная сильная обрезка части кроны или побегов ветвей является эффективным методом омоложения и/или задержки созревания ювенильного материала [63, 64]. Отмечено, что жизнеспособность даже для стареющих трав и ряда однолетников можно восстановить путем обрезки кончиков стеблей, чтобы снять верхушечное доминирование и, тем самым, способствовать перераспределению гормонов [20]. Для древесных растений распределение питательных веществ также может быть изменено путем обрезки, а новые особи, формирующиеся из ветвей, отрастающих от места хеджирования, часто превосходят исходные экземпляры с точки зрения их роста и репродуктивной силы [65].

Так, методом хеджирования, повторными обрезками ветвей, был омоложен растительный материал *Rhododendron sp.* [66]. Аналогичные результаты получены на *Citrus limon*, *Balanites*

aegyptiaca, *Syzygium cuminii* и ряде других индийских древесных пород, которые являются важными производителями биомассы и сырья для фармацевтической промышленности [28].

Этот подход применим и к хвойным. Некоторые хвойные деревья реагируют на сильную обрезку или повреждение огнем образованием молодых побегов из ветвей или корней, которые легче укореняются, чем зрелые побеги [49]. Обработанные хеджированием *Pinus radiata* сохраняют состояние молодости более 27 лет [12]. Сохранение ювенильных характеристик за счет повторной обрезки описано и для *Picea abies* [67]. Если новый прирост у сеянцев этих видов удалять ежегодно или раз в два года, образующиеся в последствии пазушные побеги остаются ювенильными в течение многих лет и служат источником для массового получения укоренившихся черенков, которые ведут себя как сеянцы [49].

4. Использование корневых отпрысков, коппинг

Другим способом искусственного и/или естественного омоложения взрослых растений, или стареющих особей в природной среде является коппинг (soppicing) (рис. 1г), заключающийся в обрезке или значительном повреждении надземной части деревьев и кустарников таким образом, чтобы побудить их дать новые побеги из прикорневой зоны (стула) или области основания ствола [20]. Именно эта зона вблизи корневого соединения и надземного побега, наряду с некоторыми другими, является более морфогенетически компетентной и содержит клетки в составе эпикормических (спящих) почек, способные регенерировать новый организм [14, 15].

Принято считать, что хронологический возраст корней растений не увеличивается с развитием особи; то есть корни являются самой молодой частью растения и их клетки характеризуются значительной способностью к делению [68]. Экспланты побегов прикорневой зоны обладают лучшим потенциалом удлинения стебля и большей укореняемостью, чем побеги, регенерированные из кроны [19]. Такие прикорневые побеги обычны для лиственных пород, и их можно использовать для вегетативного размножения и клонирования [12, 34]. Метод коппинга, например, был применен для оценки порослевого потенциала взрослых (от 2 до 10 лет) деревьев *Acacia mearnsii*. Через 3 нед. после рубки на пнях деревьев всех возрастных групп отмечали поросль, которая впоследствии была использована как материал для массового разведения черной акации [19]. На безлистных побегах 35-летнего дерева лоха узколистного (*Elaeagnus angustifolia*) показано, что базальные части эксплантов дают больше пазушных побегов, чем верхние части, а черенки, взятые из побегов, формирующихся

в прикорневой области, обладают большей укореняемостью, чем черенки, взятые из побегов, формирующихся в верхней части растения [69].

Коппинг, который эффективен для многих лиственных пород, в целом не подходит для хвойных [11]. За исключением нескольких видов, таких, например, как *Sequoia sempervirens*, *Pinus serotina*, *Taxodium distichum*, *Cunninghamia lanceolata*, большинство хвойных не дают молодых прикорневых побегов, потенциально пригодных для вегетативного размножения [6, 70]. В то же время использование коппинга позволило размножить зрелые *Sequoia sempervirens* из базальных ростков, культивируемых *in vitro* [71].

5. Инициация развития пазушных и эпикормических почек

Омолаживающий эффект на зрелые растения может оказывать процесс образования адвентивных побегов из пазушных и эпикормических почек, поскольку все адвентивные побеги являются ювенильными (рис. 1д) [1]. Эпикормические почки в обычных условиях находятся в спящем состоянии под корой, их рост подавляется гормонами, поступающими из вышерасположенных активно развивающихся побегов [72]. При определенных условиях эти почки развиваются в активные побеги, например, когда повреждаются вышерасположенные части растения или, когда уровень освещенности увеличивается после удаления близлежащих растений [28]. Так, в работе с использованием взрослых деревьев *Quercus robur* было показано, что изолированные срезы ствола, помещенные во влажные теплые условия, могут давать побеги из активированных эпикормических почек [73]. В этом же эксперименте установлено, что гирдлинг (girdling — снятие кольца коры по всей окружности ствола) интактных деревьев может стимулировать рост побегов из эпикормических почек в течение следующего вегетационного периода. Побеги эпикормического происхождения, пригодные для вегетативного размножения, были получены также для ряда видов родов *Betula*, *Acer*, *Quercus* и др. [74–76].

Эпикормические почки и побеги встречаются у многих древесных пород, но не у всех. Так, они отсутствуют у большинства хвойных [28]. При этом, укорененные растения были получены из пазушных почек взрослых деревьев некоторых видов сосны, таких как *Pinus pinea*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. massoniana* и *P. sylvestris*, а также ели *Picea sitchensis* в ходе лабораторных исследований [77–81]. Следует учитывать, что этот метод применительно к хвойным пока имеет много ограничений, включая отсутствие потенциала для масштабирования, так как таким образом удастся регенерировать только ограниченное количество растений [16].

Для увеличения эффективности вегетативного размножения через инициацию пазушных и эпикормических почек могут быть использованы следующие технологии: прививка, повторная прививка, укоренение черенков.

6. Прививка и микропрививка

Техника прививки (рис. 1е) может проводиться как одна из стадий размножения после инициации спящих и пазушных почек, так и самостоятельно — путем прививания непосредственно верхушек сформированных побегов.

Восстановить способность к вегетативному размножению, вернуть компетентность к размножению через омоложение можно путем прививания отростка взрослого растения к молодому подвою [54]. При многократной прививке кончиков взрослых побегов на юные подвой признаки взрослого состояния привоя постепенно исчезают, а вновь сформированные особи проявляют ювенильные характеристики, такие, например, как задержка цветения [82]. Прививание зрелых частей растения к молодым, часто сеянцам, использовалось для получения качественных черенков. Такие черенки, полученные после серийной прививки, обладают повышенной укореняемостью и проявляют стойкие ювенильные признаки [28]. В ряде случаев побеги, полученные методом прививания, демонстрируют усиленную пролиферацию и могут быть использованы для микроразмножения, основанного на микропрививке [23]. Микропрививка, прививка *in vitro* небольших верхушек побегов или боковых почек на обезглавленные саженцы подвоя, была разработана для деревьев с целью омоложения представителей элитных сортов и реликтовых видов для облегчения их вегетативного размножения. Такой метод имеет преимущества, заключающиеся в повышении способности к укоренению полученного материала, восстановлении жизнеспособности клонов и уменьшении генетических различий внутри клонов [20]. Так показано, что повторная прививка побегов калопанакса семилопастного (*Kalopanax septemlobus*) приводила к омоложению тканей и, в конечном счете, к высокоэффективному образованию соматических зародышей у этого неподдающегося вегетативному размножению реликтового ценного вида [26]. Использование повторной прививки зрелого материала с последующим укоренением черенков показано и дало положительные результаты также для ряда хвойных видов, таких как *Pinus massoniana*, *P. taeda*, *P. Radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Thuja plicata*, *Larix decidua*, *Cupressus dupreziana* [17, 23, 83]. В экспериментах с растительным материалом *Sequoia sempervirens* установлено, что прогрессивное омоложение происходило после последовательной прививки взрослого материала

на ювенильные черенки и стабильность омоложенного состояния сохранялась *in vitro* даже после 30 лет культивирования [84]. К сожалению, прививка не используется для массового размножения хвойных, а, в основном, ограничивается созданием семенных садов [6].

7. Повторное субкультивирование

Одним из перспективных методов вегетативного клонального размножения растений является их черенкование (рис. 1ж) [11]. При этом зачастую очень остро стоит вопрос инициации корнеобразования у черенков и их укоренения. Для значительной части лиственных древесных видов это не является проблемой [85]. К сожалению, для большинства хвойных черенки, способные к корнеобразованию, доступны только от растений, которые слишком молоды, чтобы продемонстрировать свой потенциал роста [49]. Для решения данного вопроса нашли применение технологии, основанные на методах культуры растительных клеток органов и тканей [79].

Омоложение, также, как и поддержание ювенильного состояния, может быть достигнуто или ускорено путем последовательного повторного субкультивирования растительного материала в условиях *in vitro* (рис. 1з) [86]. В качестве такого материала часто используются верхушки побегов [10]. Именно апексы побегов считаются наиболее активным местом клеточного деления и обладают характеристиками эмбриональных стволовых клеток [20].

Микроразмножение *in vitro* в контролируемых условиях позволяет непрерывно “воспроизводить” растения. При этом экспланты, взятые от взрослых растений, теряют свое текущее состояние развития в условиях непрерывного культивирования тканей в течение нескольких генераций. Считается, что перепрограммирование дифференцированных клеток, которое позволяет соматическим клеткам приобретать статус эмбриональных стволовых клеток и, таким образом, индуцировать формирование плюрипотентных стволовых клеток, как бы обращает вспять таймер развития растения [87].

Исходя из этой идеи, была создана технология так называемого “серийного размножения”, которая базируется на методике, разработанной для ювенильных побегов лиственницы [88]. Она основана на повторном вырезании и пересеве верхней части побегов, полученных путем микроразмножения, каждый раз, когда эти побеги достигают определенной длины. В частности, данная технология использована при серийном культивировании верхушек побегов 140-летнего дерева *Larix decidua* [89]. В данной работе установлено, что наилучшая регенерация адвентивных корней, а также укоренение и выживание растений происходили после четырнадцати суб-

культивирований, когда формирующаяся хвоя проявляла полностью ювенильную морфологию. Частота укореняемости черенков 3-летних микроразмноженных растений этой лиственницы оказалась в 10 раз выше, чем у черенков, взятых непосредственно от материнского растения.

Таким же образом использование технологии серийного субкультивирования привело к улучшению укоренения микроразмноженных побегов ряда древесных видов, таких как *Sequoia sempervirens*, *Pinus sylvestris*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *Picea abies*, *Picea sitchensis* и другие [18, 37, 63].

8. Соматический эмбриогенез

Истинным омоложением в полной мере можно считать образование зиготы, формирующейся при слиянии гамет, возникших в результате мейоза [49]. Таким образом, процесс эмбриогенеза, безусловно, представляет собой прямой способ омоложения [28]. Исходя из этого, довольно привлекательным и перспективным методом омоложения взрослых растений в лабораторных условиях является соматический эмбриогенез (рис. 1и). С точки зрения морфологии он очень напоминает зиготический эмбриогенез и дает возможность клонального тестирования и генетического улучшения, которое в этом случае более достижимо, чем при использовании других технологий [21].

Соматический эмбриогенез, кроме того, считается наиболее эффективной системой регенерации растений среди различных методов размножения в системе *in vitro*. Начиная с получения первого соматического зародыша от древесного вида в 1986 г. (индукция была зарегистрирована у липы амурской – *Tilia amurensis*), к настоящему моменту отработаны различные протоколы систем прямого или непрямого соматического эмбриогенеза для хвойных и лиственных пород [90]. Однако большинство этих технологий разработано с использованием ювенильных тканей, чаще всего, на основе незрелых или зрелых зиготических зародышей. Микроразмножение и соматический эмбриогенез труднодостижимы на материале старше стадии проростков [10]. Таким образом, возникает вопрос, насколько соматический эмбриогенез доступен в настоящее время для целей омоложения растительного материала?

Попытки ряда исследовательских групп индуцировать эмбриональные ткани из вегетативных эксплантов на сегодняшний день имеют ограниченный успех. Высказано предположение, что такая ситуация связана с эпигенетическим подавлением эмбриогенности (хотя и потенциально обратимым), которое лежит в основе индукции соматического эмбриогенеза [91]. Но в последнее время достигнуты значительные успехи и разработаны новые подходы

в соматическом эмбриогенезе на основе материала, получаемого от зрелых деревьев [90].

Вероятность индукции соматического эмбриогенеза некоторых видов повышается за счет использования материала, предварительно полученного в системе *in vitro*. Показано, что саженцы и молодые растения, сформированные из соматических зародышей, обладают в большей степени ювенильными характеристиками, чем их аналогичные по возрасту зиготические аналоги [92]. Кроме того, соматический эмбриогенез легче инициировать из материала взрослых растений, ранее уже полученных путем соматического эмбриогенеза, чем от растений, полученных из семян [10].

Первая индукция соматического эмбриогенеза на вегетативных эксплантах (почках) была проведена с использованием материала 3-летних деревьев *Picea abies* [93]. Но никаких результатов по дальнейшему росту и развитию соматических растений (растений-регенерантов) опубликовано не было [18]. В другом исследовании на *P. abies* использовали эксплантаты примордиальных побегов 4–6-летних соматических деревьев, при этом 2 генотипа из 39 дали реакцию на индукцию соматического эмбриогенеза [94]. Обнаружено также, что молодая хвоя одно-трехлетних деревьев европейской ели имеет положительную реакцию на индукцию соматических эмбрионов [93]. Однако, эта способность утрачивается по мере взросления деревьев-доноров [14].

Положительного результата в индукции соматического эмбриогенеза удалось достигнуть при использовании в качестве эксплантов продольных срезов примордиальных побегов 10-летнего дерева *Picea glauca*, которые были вырезаны из вегетативных почек ранней весной, или из развивающихся почек ранней осенью [95].

Известно, что соматический эмбриогенез может быть индуцирован на эксплантах апикальных побегов и из вторичной хвои взрослых деревьев (возрастом 10–20 лет) различных тропических и субтропических видов сосны из Южной Африки и северо-восточной Индии: *Pinus patula*, *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana* [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные в предыдущих разделах результаты наглядно демонстрируют имеющиеся на сегодняшний день возможности получения “омоложенного” растительного материала, в том числе, и для видов древесных растений, играющих важнейшую роль в функционировании как природных лесных, так и урбанизированных экосистем. Особенность настоящего момента, однако, состоит в том, что все известные процедуры по искусственному возвращению отдельных частей взрослых растений в юное

состояние путем переключения тем или иным способом генной стратегии развития с фазы зрелости к ювенильному состоянию реализованы, в основном, в лабораторных условиях и недостижимы пока в промышленных масштабах. Работу по созданию соответствующих промышленных биотехнологий еще предстоит выполнить.

С уверенностью можно ожидать, что с учетом ошеломляюще быстрого развития омиксных направлений, достижений молекулярной генетики, биоинформатики, системной компьютерной биологии уже в ближайшее время удастся выявить как генные кластеры и генные сети, активно функционирующие в ювенильный период развития древесных растений, так и молекулярно-генетические системы управления процессом реювенилизации. Реконструкция генных сетей, функционирующих в ювенильный период, как и компьютерное моделирование переключения с фазы зрелости к ювенильному периоду развития могут стать базой для создания принципиально новых технологий лесовосстановления, основанных на понимании молекулярно-генетической природы реювенилизации.

В заключение важно подчеркнуть, что с общих позиций рутинное клонирование взрослых растений путем соматического эмбриогенеза с получением физиологически нормального потомства может послужить также средством быстрого улучшения ценных генетических признаков основных лесообразующих пород [21].

Наиболее желательной можно считать ситуацию, когда достигнутое с использованием одного из вышеописанных подходов размножение сопровождается получением потомства, полностью идентичного исходному генотипу. В этом случае период полевых испытаний клонов, как это делается при получении соматических эмбрионов из зиготических зародышей, становится ненужным, что создает значительную экономию времени и средств. Отметим, что при размножении в этом случае появляется возможность вести отбор сразу по нескольким признакам.

Авторы выражают благодарность к.б.н Н.Е. Коротаевой за детальное ознакомление с рукописью и ценные предложения по ее улучшению.

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giri C.C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview // *Trees*. 2004. V. 18. P. 115. <https://doi.org/10.1007/s00468-003-0287-6>

2. Global Forest Resources Assessment 2020: Main report. Rome: FAO. 2020. 186 p. <https://doi.org/10.4060/ca9825en>
3. *El-Kassaby Y.A., Klápště J.* Genomic selection and clonal forestry revival // Proc. 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies” September 8-12, 2014. / Eds. Park Y.S., Bonga J.M. Vitoria-Gasteiz. Spain. 2014. P. 98.
4. *Ewald D.* Micropropagation of *Larix* species via organogenesis // Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits / Eds. Jain S.M., Häggman H. Springer. 2007. P. 125. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_12
5. *Williams C.G., Savolainen O.* Inbreeding depression in conifers: implications for using selfing as a breeding strategy // For. Sci. 1996. V. 42. P. 102. <https://doi.org/10.1093/FORRESTSCIENCE/42.1.102>
6. *Bonga J.M.* Conifer clonal propagation in tree improvement programs // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 3.
7. *Krasnoperova V., Bukharina I., Islamova N.* Features introduction to the culture *in vitro* of coniferous trees // AgroEcoInfo. Electronic science-productive magazine. 2016. V. 24. № 2. (In Russian) https://agroecoinfo.ru/STATYI/2016/2/st_211.doc
8. *Isah T.* Explant rejuvenation in the clonal propagation of woody plants // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2023. V. 154. P. 209. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02520-8>
9. *Park Y.S., Bonga J.M.* Conifer micropropagation: its function in tree improvement programs // Micropropagation of Woody Plants / Eds. Ahuja M.R. Kluwer Academic. Dordrecht. 1992. P. 457. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8116-5_27
10. *von Aderkas P., Bonga J.M.* Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment // Tree Physiol. 2000. V. 20. P. 921. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.14.921>
11. *Bonga J.M.* A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers // Can. J. For. Res. 2015. V. 45. P. 379. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0360>
12. *Bonga J.M., von Aderkas P.* Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro* // Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology / Eds. Ahuja M.R., Libby W.J. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 1993. P. 182. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84175-0_12
13. *Park Y.S.* Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Ann. For. Sci. 2002. V. 59. P. 651. <https://doi.org/10.1051/forest:2002051>
14. *Bonga J.M., MacDonald J.E., von Aderkas P.* Cloning of conifers, with emphasis on mature trees. // Advances in plant biotechnology / Eds. Rao G.P., Zhao Y., Radchuck V.V., Batnagar S.K. Studium Press LLC. Houston. 2008. P. 475.
15. *Bonga J.M., Klimaszevska K., von Aderkas P.* Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2010. V. 100. P. 241. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>
16. *Trontin J-F., Aronen T., Hargreaves C., Montalbán I.A., Moncaleán P., Reeves C., Quoniou S., Lelu-Walter M.-A., Klimaszevska K.* International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 211.
17. *Wang Y., Yao R.* Optimization of rhizogenesis for *in vitro* shoot culture of *Pinus massoniana* Lamb // J. For. Res. 2019. V. 32. P. 203. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01076-8>
18. *Zarei M., Salehi H., Jowkar A.* Controlling the barriers of cloning mature *Picea abies* (L.) H. Karst. via tissue culture and co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* // Trees. 2020. V. 34. P. 637. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01945-z>
19. *Beck S.L., Dunlop R., van Staden J.* Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material // Plant Growth Regul. 1998. V. 26. P. 149. <https://doi.org/10.1023/A:1006179620554>
20. *Zhang Z., Sun Y., Li Y.* Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms // Plant Cell Reports. 2020. V. 39. P. 1249. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02577-1>
21. *Bonga J.M.* Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? // Trees. 2017. V. 31. P. 781. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1509-z>
22. *Mikhalevskaya O.B., Shabasheva A.A.* Cyclic rejuvenation in the development of shoots of canary island pine (*Pinus canariensis* C. Sm.) // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 19. <https://doi.org/10.1134/S1062360412050062>
23. *Vidoy-Mercado I., Narváez I., Palomo-Ríos E., Litz R.E., Barcelý-Mucoz A., Pliego-Alfaro F.* Reinvigoration/rejuvenation induced through micrografting of tree species: signaling through graft union // Plants. 2021. V. 10. P. 1197. <https://doi.org/10.3390/plants10061197>
24. *Birnbaum K.D., Roudier F.* Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants // Regeneration. 2017. V. 4. P. 15. <https://doi.org/10.1002/reg2.73>. eCollection 2017 Feb
25. *Ratcliffe O.J., Amaya I., Vincent C.A., Rothstein S., Carpenter R., Coen E.S., Bradley D.J.* A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants // Development. 1998. V. 125. P. 1609. <https://doi.org/10.1242/dev.125.9.1609>
26. *Moon H.K., Park S.Y., Kim Y.W., Kim S.H.* Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2008. V. 44. P. 119. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9122-5>

27. Greenwood M.S., Day M.E., Schatz J. Separating the effects of tree size and meristem maturation on shoot development of grafted scions of red spruce (*Picea rubens* Sarg.) // Tree Physiol. 2010. V. 30. P. 459. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq004>
28. Read P.E., Bavougiean C.M. *In vitro* rejuvenation of woody species // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Methods in molecular biology. V. 994 / Eds. Lambardi M. et al. Springer Science Business Media. New York. 2013. P. 383. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_30
29. Nascimento B., Sá A.C.S., Lemos L.B.D., Rosa D.P.D., Pereira M.D.O., Navroski M.C. Three epicormic shoot techniques in *I. paraguariensis* mother trees and its cutting according to the material rejuvenation degree // Cerne. 2018. V. 24. P. 240. <https://doi.org/10.1590/01047760201824032584>
30. Salomão L.C.C., Siqueira D.L.D., Silva D.F.P.D. Production of 'Ubá' mango tree submitted to rejuvenation pruning and fertilized with nitrogen // Revista Brasileira De Fruticultura. 2018. V. 40. P. e812. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018812>
31. Massoumi M., Krens F.A., Visser R.G.F., De Klerk G.M. Azacytidine and miR156 promote rooting in adult but not in juvenile *Arabidopsis* tissues // J. Plant Physiol. 2017. V. 208. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.010>
32. Irish E.E., McMurray D. Rejuvenation by shoot apex culture recapitulates the developmental increase of methylation at the maize gene *Pl-Blotched* // Plant Mol. Biol. 2006. V. 60. P. 747. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5620-6>
33. Stange L. Cellular interactions during early differentiation // Cellular Interactions. Encyclopedia of Plant Physiology. V. 17 // Eds. Linskens H.F., Heslop-Harrison J. Springer. Berlin. Heidelberg. 1984. P. 424. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69299-4_20
34. Burrows G.E. Leaf axil anatomy in the *Araucariaceae* // Aust. J. Bot. 1987. V. 35. P. 631. <https://doi.org/10.1071/bt9870631>
35. Soyars C.L., James S.R., Nimchuk Z.L. Ready, aim, shoot: stem cell regulation of the shoot apical meristem // Curr. Opin. Plant Biol. 2016. V. 29. P. 163. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.002>
36. Monteuiis O. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments // Physiol. Plant. 1991. V. 81. P. 111. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb01721.x>
37. Prehn D., Serrano C., Mercado A., Stange C., Barrales L., Arce-Johnson P. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2003. V. 73. P. 91. <https://doi.org/10.1023/A:1022615212607>
38. Ballester A., Corredoira E., Vieitez A.M. Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 56.
39. Bonga J.M. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1984. V. 62. P. 416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb04595.x>
40. Wang K.X., Karnosky D.F., Timmis R. Adventitious bud production from mature *Picea abies*: rejuvenation associated with female strobili formation // Woody plant biotechnology / Eds. Ahuja M.R. Plenum Press. New York. 1991. P. 83. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7932-4_11
41. Cardoso J.C., Martinelli A.P., Latado R.R. Somatic embryogenesis from ovaries of sweet orange cv. Tobias // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2012. V. 109. P. 171. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0073-x>
42. Michaux-Ferrière N., Grout H., Carron M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) // Am. J. Bot. 1992. V. 79. P. 174. <https://doi.org/10.2307/2445105>
43. Miyashima S., Sebastian J., Lee J.-Y., Helariutta Y. Stem cell function during plant vascular development // EMBO J. 2013. V. 32. P. 178. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.301>
44. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway // Dev. Cell. 2010. V. 18. P. 463. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.004>
45. Wu H., Hu Z.-H. Comparative anatomy of resin ducts of the *Pinaceae* // Trees. 1997. V. 11. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s004680050069>
46. Bonga J.M. Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers // In Vitro. 1981. V. 17. P. 511. <https://doi.org/10.2307/4292533>
47. Pulianmackal A.J., Kareem A.V.K., Durgaprasad K., Trivedi Z.B., Prasad K. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00142>
48. Steward F.C., Mapes M.O., Mears K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cell // Am. J. Bot. 1958. V. 45. P. 705. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>
49. Greenwood M.S. Rejuvenation of forest trees // Plant Growth Regul. 1987. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF00043947>
50. Benson E.E. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2000. V. 36. P. 141. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>
51. Zimmerman R.H., Hackett W.P., Pharis R.P. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering // Hormonal Regulation of Development III / Eds. Pharis R.P., Reid D.M. Springer-Verlag. Heidelberg. 1985. P. 79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67734-2_4
52. Niu S.H., Li Z.X., Yuan H.W., Fang P., Chen X.Y., Li W. Proper gibberellin localization in vascular tissue

- is required to regulate adventitious root development in tobacco // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert186>
53. Ivanchenko M.G., Muday G.K., Dubrovsky J.G. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2008. V. 55. P. 335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x>
 54. Poethig R.S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants // Sci. 1990. V. 250. P. 923. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.923>
 55. Kiyosue T., Takano K., Kamada H., Harada H. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions // Can. J. Bot. 1990. V. 68. P. 2301. <https://doi.org/10.1139/b90-293>
 56. Rout G.R., Samantaray S., Das P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* - a multipurpose leguminous tree // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1995. V. 42. P. 283. <https://doi.org/10.1007/BF00030000>
 57. McCabe P.F., Valentine T.A., Forsberg L.S., Pennell R.I. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 2225. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.12.2225>
 58. Schmidt E.D.L., de Jong A.J., de Vries S.C. Signal molecules involved in plant embryogenesis // Plant Mol. Biol. 1994. V. 26. P. 1305. <https://doi.org/10.1007/BF00016476>
 59. Shinshi H., Mohnen D., Meins F.Jr. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987. V. 84. P. 89. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.89>
 60. De Jong A.J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammeren A., De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 425. <https://doi.org/10.2307/3869444>
 61. Pittock C., Weinman J.J., Rolfe B.G. The activity of a tobacco basic chitinase promoter in transgenic white clover provides insights into plant development and symbiosis // Aust. J. Plant Physiol. 1997. V. 24. P. 555. <https://doi.org/10.1071/PP97019>
 62. Mo L.H., Egertsdotter U., von Arnold S. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology // Ann. Bot. 1996. V. 77. P. 143. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0016>
 63. Mason W.L., Menzies M.I., Biggin, P. A comparison of hedging and repeated cutting cycles for propagating clones of Sitka spruce // Forestry. 2002. V. 75. P. 149. <https://doi.org/10.1093/forestry/75.2.149>
 64. Mitchell R.G., Zwolinski J., Jones N.B. A review on the effects of donor maturation on rooting and field performance of conifer cuttings // Southern African Forestry J. 2004. V. 201. P. 53. <https://doi.org/10.1080/20702620.2004.10431774>
 65. Masaka K., Torita H., Kon H., Fukuchi M. Seasonality of sprouting in the exotic tree *Robinia pseudoacacia* L. in Hokkaido, northern Japan // J. For. Res. 2017. V. 20. P. 386. <https://doi.org/10.1007/s10310-015-0488-z>
 66. Clapa D., Fira A. Tissue culture and ex-vitro acclimation of *Rhododendron* sp // Bulletin University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine CLUJ-NAPOCA. 2007. V. 64. P. 39. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:1899>
 67. St. Clair J.B., Kleinschmit J., Svolba J. Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.) // Silvae Genet. 1985. V. 34. P. 42.
 68. Crawford B.C.W., Sewell J., Golembeski G., Roshan C., Long J.A., Yanofsky M.F. Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems // Sci. 2015. V. 347. P. 655. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0196>
 69. Economou A.S., Spanoudaki M.J. Regeneration *in vitro* of oleaster *Elaeagnus angustifolia* L.) from shoot tips of mature trees // Acta Hort. 1988. V. 227. P. 363. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.66>
 70. Minghe L., Faxin H. Performance of Chinese-fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) plantlets from upper-crown and basal origins as modified by grafting and development as buried ramets before explant harvest // Silvae Genet. 2001. V. 50. P. 37.
 71. Boulay M. Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects // Cell and tissue culture in forestry, case histories: gymnosperms, angiosperms and palms. V. 3 / Eds. Bonga J.M., Durzan D.J. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 1987 P. 185.
 72. Meier A.R., Saunders M.R., Michler C.H. Epicormic buds in trees: a review of bud establishment, development and dormancy release // Tree Physiol. 2012. V. 32. P. 565. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps040>
 73. Harmer R. Production and use of epicormic shoots for the vegetative propagation of mature oak // Forestry. 1988. V. 61. P. 305. <https://doi.org/10.1093/forestry/61.4.305-a>
 74. Brand M.H., Lineberger R.D. *In vitro* rejuvenation of *Betula* (*Betulaceae*): morphological evaluations // Am. J. Bot. 1992. V. 79. P. 618. <https://doi.org/10.2307/2444877>
 75. Henry P.H., Preece J.E. Production and rooting of shoots generated from dormant stem sections of *Acer* species // Hort. Sci. 1997. V. 32. P. 1274. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.32.7.1274>
 76. Vieitez A.M., Corredoira C., Ballester A., Muñoz F., Durán J., Ibarra M. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2009. V. 98. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9546-6>
 77. Selby C., Watson S., Harvey B.M.R. Morphogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud cultures-tree maturation and explants from epicormic shoots // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2005. V. 83. P. 279. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-7016-3>

78. Cortizo M., De Diego N., Moncalean P., Ordas R.J. Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.) // *Trees*. 2009. V. 23. P. 835. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0325-0>
79. De Diego N., Montalban I.A., Fernandez de Larrinoa E., Moncalean P. *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees // *Can. J. For. Res.* 2008. V. 38. P. 2607. <https://doi.org/10.1139/x08-102>
80. De Diego N., Montalban I.A., Moncalean P. *In vitro* regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees // *South African J. Bot.* 2010. V. 76. P. 158. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.09.007>
81. Wan Y., Fan F. Direct organ regeneration from apical shoot buds of adult *Pinus massoniana* Lamb // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2024. <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10415-2>
82. Boulay M. *In vitro* propagation of tree species // *Plant tissue and cell culture* / Eds. Green C.E., Somers D.A., Hackett W.P., Biesboer D.D. Liss. New York. 1987. P. 367.
83. Fraga M.F., Cañal M.J., Aragonés A., Rodríguez R. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting // *Ann. For. Sci.* 2002. V. 59. P. 155. <https://doi.org/10.1051/forest:2002002>
84. Chang I.-F., Chen P.-J., Shen C.-H., Hsieh T.-J., Hsu Y.-W., Huang B.-L., Kuo C.-I., Chen Y.-T., Chu H. A., Yeh K.-W., Huang L.-C. Proteomic profiling of proteins associated with the rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl // *Proteome Sci.* 2010. V. 8. P. 64. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-64>
85. Ondro W.J., Couto L., Betters D.R. The status and practice of forestry in Brazil in the early 1990s // *For. Chronicle*. 1995. V. 7. P. 106. <https://doi.org/10.5558/tfc71106-1>
86. Su X.C. Study on the differences of the seedling of different generations from successive tissue culture of Chinese fir clone // *J. Fujian College Forestry*. 2000. V. 20. P. 353.
87. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Aging epigenetics: accumulation of errors or realization of a specific program? // *Biochem.* 2015. V. 80. P. 1406. <https://doi.org/10.1134/S0006297915110024>
88. Hübl S., Zoglauer K. Entwicklung einer Vermehrungsmethode für züchterisch wertvolle Lärchen. Beitr // *Forstwirtschaft*. 1991. V. 25. P. 18.
89. Kretzschmar U., Ewald D. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques // *Plant Physiol.* 1994. V. 144. P. 627. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)82149-8](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)82149-8)
90. Castander-Olarieta A., Moncaleán P., Montalbán I.A. Somatic embryogenesis in Pines // *Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology*. V. 2527/ Eds. Ramírez-Mosqueda M.A. Humana. New York. 2022. P. 41. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_4
91. Klimaszewska K., Rutledge R.G. Is there potential for propagation of adult spruce trees through somatic embryogenesis? // *Vegetative propagation of forest trees* / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 195.
92. Ruaud J.N., Bercetche J., Paques M. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants // *Plant Cell Rep.* 1992. V. 11. P. 563. <https://doi.org/10.1007/BF00233093>
93. Harvengt L., Trontin J.F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // *Planta*. 2001. V. 213. P. 828. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
94. Varis S., Klimaszewska K., Aronen T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from primordial shoot explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. somatic trees // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1551. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01551>
95. Klimaszewska K., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during tissue culture process // *Planta*. 2011. V. 233. P. 635. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1325-4>