

УДК 630.*165.6

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЕМЯН КЕДРА СИБИРСКОГО¹

© 2023 г. И. Н. Третьякова*

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, Академгородок, д. 50/28, Красноярск, 660036 Россия

*E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 02.12.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Проведено изучение биологических свойств семян сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour). В работе использовали четыре фракции семян, отличающиеся по степени крупности: фракцию крупных семян (длина 11–14 мм), фракцию средних семян (длина 9–10 мм), фракцию мелких семян (длина 7–8 мм) и фракцию очень мелких семян (длина <6 мм). Изучение качества семян по данным рентгенографии и гистохимического анализа показало, что по размеру семян можно судить об их дефектности. Фракции мелких и очень мелких семян сосны сибирской оказались полностью стерильными, большая часть семян крупной и средней фракции – жизнеспособными. Цитозэмбриологические исследования показали, что у деревьев, формирующих пустые и недоразвитые семена (фракции средних и крупных семян), наблюдаются нарушения в развитии эмбриологических структур. Эти нарушения проходят на стадии гаметофитогенеза и развития архегониев. У деревьев с крупными семенами гаметофитогенез идет без отклонений, в семязачатках формируется четыре архегония, и образуются полиэмбриональные семена (до 16 эмбрионов в зародышевом канале). У деревьев сосны сибирской с однолетним репродуктивным циклом размер семян варьирует от очень мелких до крупных. У этих деревьев развитие женского гаметофита завершается и образуются архегонии. Однако в семязачатках деревьев с однолетним репродуктивным циклом оплодотворение яйцеклеток не происходит, и образуются семена без зародыша. За период стратификации (четыре месяца) у большинства семян средней и крупной фракции внутрисеменной рост зародыша полностью завершается. В культуре *in vitro* на среде MS с низкой концентрацией гормонов рост зародышевой оси осуществляется за семь дней культивирования. Зародыши успешно прорастают. Таким образом, на основании опытов по культивированию зародышей сосны сибирской можно сделать вывод о наличии у семян данного вида органического (морфофизиологического) покоя. При создании оптимальных условий для прорастания (питательного субстрата, температуры $24 \pm 1^\circ\text{C}$) семена сосны сибирской способны прорасти.

Ключевые слова: сосна сибирская, семена, стратификация, культура *in vitro*, рентгенография, гистохимический анализ, эмбриональные структуры, органический покой.

DOI: 10.31857/S0024114823060104, **EDN:** EJWSYO

Качество семян высших растений зависит от реализации программы развития в процессе эмбриогенеза, ведущей к их успешному прорастанию. У большинства видов хвойных развитие семян (семяпочек) происходит в течение одного вегетационного периода. Семена лиственницы (*Larix*), ели (*Picea*), пихты (*Abies*) за этот период завершают эмбриональное развитие и находятся в вынужденном покое. К семенам с вынужденным покоем относятся и семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с двухлетним эмбрио-

нальным циклом. Для запуска прорастания семян с вынужденным покоем достаточно поместить их во влажную среду (Obrouheva, 2021). Семена сосны сибирской с двухлетним циклом развития семяпочек имеют недоразвитый зародыш и требуют длительной стратификации, в течение которой осуществляется внутрисеменной рост зародыша (Данович, 1982). Остается непонятным, каким типом покоя (вынужденным или глубоким) обладают семена сосны сибирской – типичного представителя кедровых сосен.

Биология семян сосны сибирской неоднократно описывалась в литературе – изучались происходящие в семяпочках процессы эмбриогенеза (Некрасова, 1972; Третьякова, 1990) и внутрисеменного роста зародыша при стратификации (Данович, 1982; Третьякова и др., 1997). Семена сосны сибирской имеют твердую семенную ко-

¹ Работа выполнена в рамках базового проекта ИЛ СО РАН-2021–2025 “Функционально-динамическая индикация биоразнообразия лесов Сибири” № 0356-2021-0009 и при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 22-14-20008.

журу темно-коричневого цвета, эндосперм (мегагаметофит) и недоразвитый зародыш. Размер семян сосны сибирской колеблется в длину от 6 до 14 мм (Третьякова и др., 1997). При этом пустые семена данного вида не отличаются по размерам и морфологическим признакам от полнозернистых. Поэтому определить качество семян сосны сибирской по внешнему виду невозможно.

Известно, что размер семян сосны сибирской — признак неустойчивый. Этот показатель зависит от условий местопроизрастания, погоды в период созревания семян, возраста дерева, места шишки в кроне дерева и количества семян в шишке (Некрасова, 1972; Ирошников, 1974). В то же время в природных популяциях встречаются отдельные генотипы деревьев, стабильно продуцирующие крупные или мелкие семена. Так, А.И. Ирошниковым в низкогорной популяции Западного Саяна отмечены особи с крупными семенами и мелкими, недоразвитыми семенами (Ирошников, 1974). Не исключено, что размер семян может отражать их биологические свойства.

Цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей развития и прорастания семян разной крупности сосны сибирской. Необходимо было выяснить, можно ли по морфологическим показателям семян данного вида судить об их качестве и селекционной ценности.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на семенах сосны сибирской, собранных в низкогорных древостоях Западного Саяна. Опытные семена разделялись на

четыре фракции в зависимости от их длины: крупную (длина 11–14 мм), среднюю (длина 9–10 мм), мелкую (длина 7–8 мм) и очень мелкую (длина <6 мм). Характеристика каждой фракции приводится в табл. 1. В каждой фракции анализировалось не менее 5000 семян.

Качество семян оценивалось с помощью рентгенографии и гистохимического анализа. При рентгенографии (проводилась на рентгеновском аппарате типа АТР-1) семян была использована схема, разработанная А.И. Ирошниковым для сосны сибирской (ОСТ 56-94-87). Согласно этой схеме все семена были разделены на пять категорий в зависимости от степени развития зародыша, его формы, дефектности зародыша и эндосперма (наличие темных пятен и перетяжек) (табл. 2).

Гистохимический анализ семян проводился прижизненным окрашиванием на крахмал зародыша и эндосперма при помощи реакции Люголя (Дженсен, 1965).

Семена проращивали в культуре *in vitro* на среде MS (без гормонов и с добавлением ИУК 0.5 мг л⁻¹, кинетина 0.2 мг л⁻¹) при температуре 24 ± 1 °С. Цитоэмбриологические исследования проводили на семенах отдельных деревьев, из года в год продуцирующих семена разного качества (Ирошников, 1974): дерево № 704, формирующее недоразвитые семена; дерево № 217, образующее пустые семена; деревья № 492 и № 808, образующие крупные полиэмбриональные семена, а также деревья, формирующие семена, которые созревают по однолетнему репродуктивному циклу, как у лиственницы, ели, пихты (Третьякова, 1990;

Таблица 1. Характеристика семян сосны сибирской разной крупности

Фракция семян	Длина, мм указаны min–max	Ширина, мм указаны min–max	Вес 1000 семян в г
Крупная	11–14	7.5–10	2825 ± 30.9 ^a
Средняя	9–10	6.5–7.4	2217 ± 24.9 ^a
Мелкая	7–8	4.5–6.5	954. ± 29.9 ^b
Очень мелкая	<6	2.0–4.5	453.5 ± 25.4 ^c

* Примечание. В таблице приведена ошибка среднего арифметического значения. Средние значения, отмеченные разными буквами, достоверно различаются при $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Типы категории семян (ОСТ 56-94-87)

Тип категории семян	Характеристика зародыша и эндосперма
I	Зародыш занимает большую часть семени
II	Зародыш с деформациями и перетяжками
III	Зародыш занимает в поперечнике 0.3–0.6 зародышевого канала “дистрофики”
IV	Зародыш с перетяжками. По диаметру аналогичен III категории
V	Повреждения эндосперма

Свинцова, Третьякова, 2014). С учетом уникальности этих форм, их статуса ценных моделей для изучения процессов репродуктивной системы в ходе наблюдений за ними были закреплены индивидуальные номера (Ирошников, 1974). Сборы мегастробиллов проводили в течение вегетационного периода. Семяпочки фиксировали в смеси этилового спирта (96%) и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Дальнейшую обработку материала и приготовление постоянных препаратов проводили в соответствии с общепринятой методикой (Паушева, 1970). Срезы окрашивали проционовыми красителями — ярко-синим RS и ярко-красным 2BS (Иванов, 1982). Препараты анализировали на микроскопе МИКМЕД-6 (Россия). Фотографии микропрепаратов выполняли при помощи цифрового фотоаппарата Olympus FE-5020 (Япония).

Стратификацию семян проводили в горшочках во влажном песке в условиях холодильной камеры при температуре $+2...+4^{\circ}\text{C}$ в течение четырех месяцев. Через каждый месяц стратификации осуществляли рентген семян и их гистохимический анализ (реакция Люголя). Проращивание семян проводили в горшочках во влажном песке при температуре $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0 по стандартным методикам. Достоверность различий определялась однофакторным дисперсионным анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качество семян

Результаты проведенных исследований показали, что семена крупной фракции сосны сибирской оказались в 3 раза тяжелее семян мелкой фракции и в 6 раз тяжелее семян очень мелкой фракции. Гистохимический анализ семян каждой категории показал, что у жизнеспособных семян сосны сибирской четко окрашенный зародыш без темных пятен и полос. Такие зародыши занимают более чем $\frac{1}{4}$ часть зародышевого канала и имеют четкую внутреннюю дифференцировку на две полярные меристемы. К жизнеспособным были отнесены и семена с перетяжками на зародышах (категории семян II и III), с изгибами зародышей (категория семян IV) (табл. 2). Группу нежизнеспособных составили семена, имеющие зародыши <2 мм (точковые зародыши). У таких семян корневая меристема гистологически не выражена, в то время как другие ткани зародыша сформированы. К нежизнеспособным были отнесены и семена, у которых зародыши имели темные пятна в области гипокотыля и корешка. Категорию нежизнеспособных семян составили семена с аморфным эндоспермом и зародышем. При

окрашивании такие семена остаются бесцветными. Также к категории нежизнеспособных семян были отнесены семена V категории, у которых на эндосперме имелись пятна 5–7 мм.

Рентгенография семян сосны сибирской разной крупности позволила выявить наличие определенной зависимости между величиной семян и их дефектностью (табл. 3). Фракции мелких и очень мелких семян оказались полностью стерильными. У фракции мелких семян только 12% формировали небольшие зародыши длиной от 1 до 3 мм, у которых корневые меристемы не образовывались. При применении двойной стратификации зародыши таких семян способны пройти внутрисеменной рост, и семена прорастают (Данович, 1982).

У семян средней фракции нежизнеспособные семена (пустые, без зародыша и дефектные) составили 29.9%, семена с зародышем менее 3 мм — 42.5%. Жизнеспособность семян крупной фракции оказалась немного выше семян средней фракции — 69.1%. У крупных семян 28.2% зародышей занимали более половины зародышевого канала. Аналогичные зародыши у семян средней фракции составляли 15.9% ($F = 6.17 \geq F_{кр}$, различия статистически достоверны при $p \leq 0.05$).

В период стратификации внутрисеменной рост зародыша происходит одинаково у семян крупной и средней фракции. За 4 мес. стратификации у 70% семян крупной фракции и 37.3% средней фракции зародыши заняли большую часть коррозийной полости (табл. 3). Дефектность семян к концу стратификации составляла у крупных семян 29.1%, средних — 45.7% за счет появления темных пятен в области эндосперма, однако различия статистически недостоверны. Точковые зародыши у семян крупной фракции исчезали (табл. 3).

Ранее нами проводилось цитозембриологическое исследование семян у деревьев сосны сибирской, которые постоянно из года в год продуцируют семена определенного качества: недоразвитые (дерево 704), пустые (дерево 217), многозародышевые семена (дерева 492 и 808) (Третьякова, 1990). Семена указанных выше деревьев по размерам не отличаются (табл. 4). Кроме того, в древостоях гор Южной Сибири редко, но систематически встречаются деревья сосны сибирской, у которых семена развиваются по однолетнему генеративному циклу (Третьякова, 1990; Свинцова, Третьякова, 2014; Третьякова, Лукина, 2016). У деревьев с однолетним циклом развития формируются семена разного размера, т.е. семена по размерам относятся к разным фракциям (рис. 1).

Исследование развития семяпочек указанных выше деревьев показало, что развитие эмбриональных структур идет по одной схеме, характерной для рода *Pinus*. В первый год внепочечной



Рис. 1. Семена сосны сибирской с однолетним репродуктивным циклом, дерево № 100ш (фото Шуклиной А.Н.).

жизни протекают процессы микро- и мегаспорогенеза, гаметогенеза и опыления. Во второй вегетационный период завершаются процессы гаметогенеза, оплодотворения и развития зародыша (Третьякова, 1990). У деревьев № 217 и № 704 (фракция крупных семян), формирующих недоразвитые и пустые семена, наблюдается деградация свободной ядерной женского гаметофита до оплодотворения, что приводит к разрушению за-

родышевого мешка (рис. 2а, 2б, 2в). В норме в семяпочках сосны сибирской в этот период происходит стремительное увеличение размеров женского гаметофита (в 6–7 раз), образование клеточного мегagamетофита и архегониев (Третьякова, 1990). Такая интенсификация роста сопровождается усилением обменных процессов в семяпочке и зародышевом мешке и в первую очередь трофических и гормональных (Минина, Ларионова, 1979). У

Таблица 3. Состояние семян разной крупности сосны сибирской в процессе стратификации (%)

Фракция семян	Размер зародыша, мм				Семена без зародыша	Пустые семена	Дефектные семена Эндосперм : Зародыш
	1—3	4—5	6—7	8—9			
КРУПНАЯ							
До стратификации	11.9	40.9	25.6	2.6	1.8	2.4	6.8 : 8.1
1.5 мес. стратификации	1.5	28.0	49.0	2.5	2.3	2.3	10.5 : 4.0
3 мес. стратификации	1.1	24.7	41.5	2.7	2.7	2.5	20.2 : 4.5
4 мес. стратификации	0	12.0	25.0	33.1	2.7	2.5	20.7 : 4.0
СРЕДНЯЯ							
До стратификации	42.5	47.8	15.8	0.1	4.6	3.0	3.0 : 13.3
1.5 мес. стратификации	4.5	32.5	33.0	2.0	3.0	3.0	10.5 : 11.5
3 мес. стратификации	2.8	15.7	35.3	1.8	5.7	4.5	21.0 : 12.8
4 мес. стратификации	2.8	9.5	27.3	17.5	4.9	4.0	21.0 : 13.0
МЕЛКАЯ	12.0	0	0	0	0	88.3	0 : 0
ОЧЕНЬ МЕЛКАЯ	0	0	0	0	0	100	0 : 0

Таблица 4. Размеры семян деревьев сосны сибирской, формирующих семена определенного качества

№ дерева	Длина, мм (max–min)	Ширина, мм (max–min)
217	11.5 ± 0.03	8.1 ± 0.03
704	10.4 ± 0.02	7.8 ± 0.03
808	13.7 ± 0.05	9.7 ± 0.07
492	13.1 ± 0.06	8.5 ± 0.05
Деревья с однолетним циклом развития шишек	3–10.7	2–8

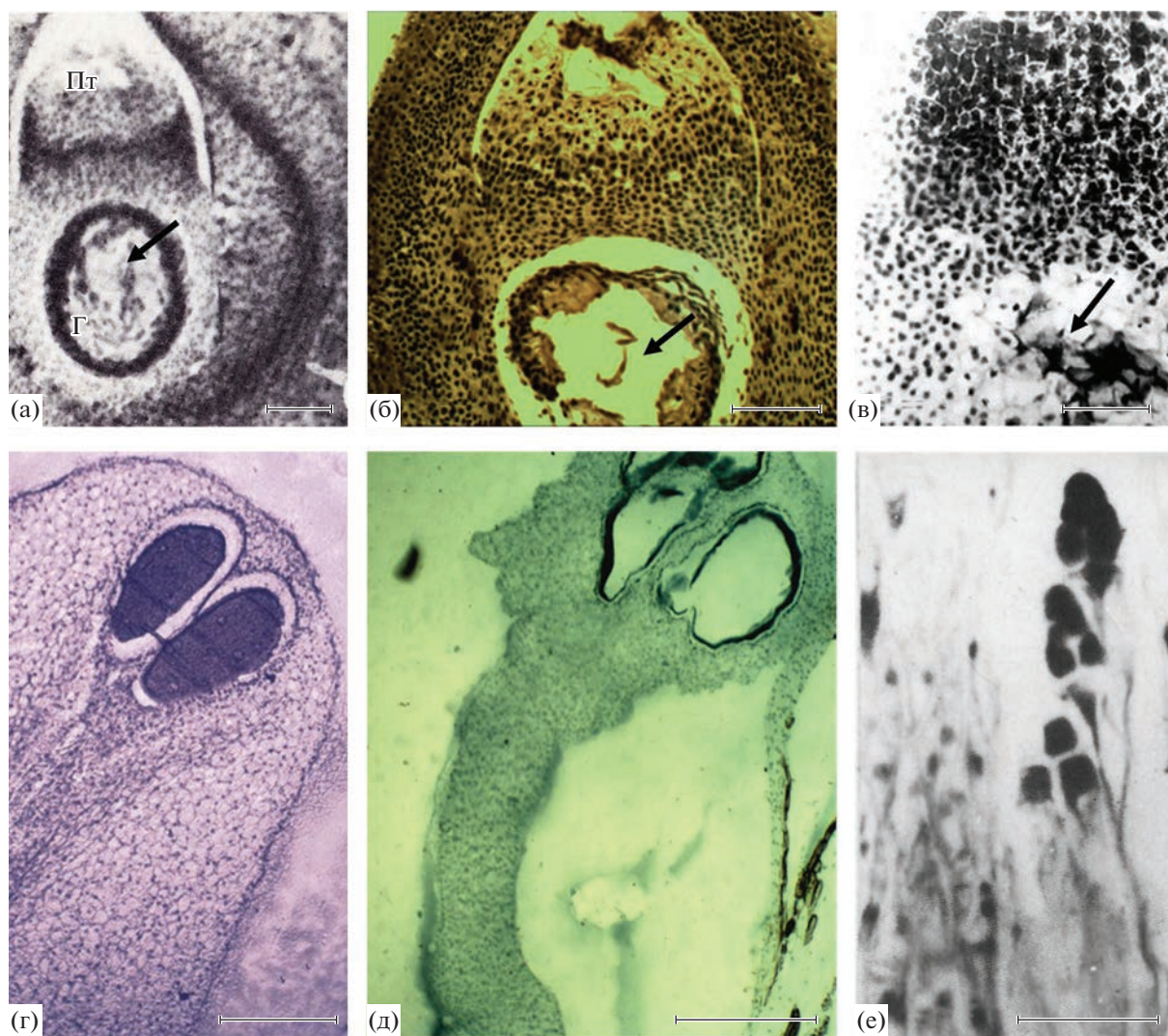


Рис. 2. Развитие эмбриональных структур у сосны сибирской: (а) – семечка первого года в конце первого вегетационного периода (дерево № 492), ПТ – пыльцевые трубки в нуцеллусе, (б) – деградация женского гаметофита в конце первого вегетационного периода (дерево № 217), (в) – деградация женского гаметофита (дерево № 704). Стрелкой указан свободная ядерный женский гаметофит, (г) – 2 зрелых архегония (дерево № 808), (д) – разрушенные архегонии (дерево № 217), (е) – 4 эмбриона в зародышевом канале (дерево № 492). Масштабная линейка: (а, в) – 250 мкм, (б) – 100 мкм, (г, д) – 150 мкм, (е) – 70 мкм.

30–40% семечек деревьев, формирующих недоразвитые и пустые семена, мегагаметофиты созревают, и в них образуются один, реже два архегония, в то время как у в норме у сосны сибирской формируются три-четыре архегония в семечке (рис. 2г). У дерева 492 и 808 (крупные, полиэмбриональные семена) все четыре архегония могут быть оплодотворены. В результате простой и кливажной полиэмбрионии в зародышевом канале мегагаметофита у этих деревьев формируется 16 зародышей (рис. 2е). Таким образом, полиэмбриональность семян у деревьев 492 и 808 очень высокая по сравнению с деревьями 704 и 217. У дерева 217 часто наблюдается деградация неоплодотворенных архегониев (рис. 2д). По предположению К.Н. Дановича (1985), величина семени сос-

ны сибирской определяется массой эндосперма. Этот показатель зависит не от размера клеток, а от их числа в женском гаметофите. Не исключено, что более высокая активность женского гаметофита в свободная ядерной стадии развития приводит к большему числу клеток мегагаметофита и, возможно, к большему развитию числа архегониев, их оплодотворению и развитию большего числа зародышей. Следовательно, величина семени может отражать напряженность эмбриологических процессов. Вполне вероятно, что более крупные семена имеют больший запас энергии, необходимый для прорастания семени (Данович, 1985).

Изучение формирования эмбриональных структур у форм сосны сибирской с однолетним репродуктивным циклом показало, что формирование

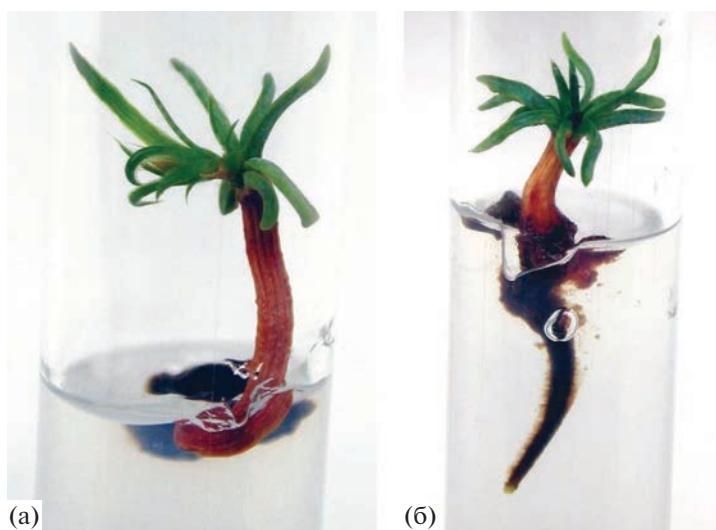


Рис. 3. Проростки сосны сибирской в культуре *in vitro*, (а) — среда MS без гормонов, (б) — среда MS с низкими концентрациями фитогормонов (ИУК 0.5 мг л⁻¹, кинетин 0.2 мг л⁻¹).

женского гаметофита и образование архегониев идут так же, как у типичных деревьев с двухлетним циклом развития. У этих уникальных деревьев происходит сокращение свободной ядерной стадии развития женского гаметофита (до 1.5 мес. вместо 1 года), сверххранное развитие архегониев и созревание яйцеклетки. Однако оплодотворение не происходит, и формируются беззародышевые семена с развитым эндоспермом и коррозионной полостью (Третьякова, 1990; Свинцова, Третьякова, 2014; Третьякова, Лукина, 2016).

Таким образом, размножение сосен — акселераторов невозможно из-за отсутствия оплодотворения и зародыша в зародышевом канале. Семена деревьев с однолетним циклом не способны к прорастанию. Однако тиражировать уникальные деревья сосны сибирской с акселерацией репродуктивного цикла можно при использовании биотехнологии соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Одной из таких биотехнологий является культура мегагаметофитов. Развитие глобулярных зародышей в условиях культуры мегагаметофитов *in vitro* у сосны сибирской были описаны нами ранее (Третьякова, Ворошилова, 2014).

Прорастание семян

При завершении процесса стратификации горшочки с семенами переносили в термостат при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Готовые к прорастанию семена закончили внутрисеменной рост зародыша и имели корешки, равные или превосходящие по длине семядоли (около 3 мм) (Третьякова и др., 1997). По готовности прорасти семена крупной и средней фракции не отличались.

Культивирование недоразвитых зародышей *in vitro*

При выращивании зародышей нестратифицированных семян сосны сибирской (длина зародыша более 5 мм) на питательной среде MS наблюдается рост зародышевой оси.

Через 1 сут культивирования наступала быстрая стадия насыщения клеток зародыша питательными веществами, на вторые сутки происходило увеличение размера корешка в 1.5 раза, на третьи сутки начиналось разрастание семядолей и приобретение ими зеленой окраски (80% эксплантов). На седьмые сутки культивирования происходило появление зародышевого корешка, отмечалось позеленение гипокотыля, семядоли разрастались — начинался процесс прорастания (рис. 3). Таким образом, вместо четырех месяцев стратификации семян сосны сибирской прорастание зиготических зародышей происходило за 7 сут. При дальнейшем культивировании в течение двух месяцев наблюдался рост эпикотыля. Однако на месте корешка шло образование каллуса (рис. 2а).

Активный рост зародышевых корешков происходил на среде MS с низкими концентрациями фитогормонов (ИУК 0.5 мг л⁻¹, кинетин 0.2 мг л⁻¹). Через 2 мес. культивирования таких проростков длина корешка составляла 10–13 см, а эпикотыля — от 3 до 5 мм (рис. 2б). Через 3 мес. происходило образование боковых корешков. Через 4 мес. длина корешков увеличивалась до 17–20 мм. Следовательно, при непрерывном культивировании *in vitro* с добавлением гормонов эмбриогенез у данного вида завершался прорастанием семян. На основании приведенных исследований по культуре *in vitro* можно предположить, что недоразвитость зародышей у сосны сибирской обусловлена

органическим покоем. По классификации М.Г. Николаевой (1982, 1985) семена сосны сибирской можно отнести к группе типа морфобиологического покоя (Б-В1). Семена с морфобиологическим покоем (группа Б) связаны с недоразвитостью зародыша. Такие семена не могут прорасти до тех пор, пока не завершится внутри-семенной рост зародыша. Этот процесс проходит в семенах сосны сибирской после отделения их от материнского организма при стратификации. Проведенные нами ранее исследования по определению содержания гормонов в семенах сосны сибирской показали, что зародыши семян содержат значительно больше гормонов (ауксина, ИУК, цитокининов и абсцизовой кислоты, АБК) по сравнению с мегагаметофитами (Tretyakova et al., 2021). Возможно, большое содержание в зародышах абсцизовой кислоты (зародыши 447 ± 16 нг/г⁻¹ сухого веса, мегагаметофиты 269 ± 13 нг/г⁻¹ сухого веса) является причиной развития у семян сосны неглубокого физиологического покоя. Воздействие на семена сосны сибирской низких положительных температур во влажном субстрате (стратификация) или регуляторов роста при культивировании зародышей на питательной среде в культуре *in vitro* будет способствовать завершению роста зародышевой оси и прорастанию зародыша. Таким образом, при создании условий, способствующих прорастанию семян (культура *in vitro* или стратификация), семена сосны сибирской способны прорасти и образовывать жизнеспособные сеянцы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семена сосны сибирской, произрастающие в Западном Саяне, отличаются по размерам, и их можно распределить по степени крупности на 4 фракции. Фракции мелких и очень мелких семян оказались полностью нежизнеспособными. Эти семена формировали только семенную оболочку, а зародыш и эндосперм у них отсутствовали (пустые семена). Цитоэмбриологические исследования показали, что семена деревьев, формирующих пустые семена, имеют нарушения в развитии эмбриологических структур на стадии развития женского гаметофита, образования единичных архегониев и отсутствия оплодотворения яйцеклеток. Крупные семена сосны сибирской характеризуются образованием и оплодотворением четырех архегониев и полиэмбриональностью. В коррозийной полости формируется 16 эмбрионов. Семена средней и крупной фракции по морфологическим признакам и весу семян не различались. Эти фракции семян обладают одинаковой способностью проходить процесс стратификации и прорастания в культуре *in vitro*. Прорастание зародышей сосны сибирской в культуре *in vitro* позволяет сделать заключение о наличии у семян

данного вида неглубокого морфобиологического покоя, который можно снять стратификацией или обработкой зародышей регуляторами роста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М.: Мир, 1965. 377 с.
- Данович К.Н. Строение и формирование семян // Физиология семян. М.: Наука, 1982. С. 5–44.
- Данович К.Н. Структурно-функциональная организация развития семян хвойных // Половая репродукция хвойных. Тезисы докл. II Всесоюзного симпозиума. Новосибирск: Наука, 1985. С. 8–10.
- Иванов В.Б. Активные красители в биологии М.: Наука, 1982. 214 с.
- Ирошников А.И. Полиморфизм популяций кедра сибирского // Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск, 1974. С. 77–103.
- Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и проявление пола у хвойных. М.: Наука, 1979. 216 с.
- Некрасова Т.П. Биологические основы семеношения кедра сибирского. Новосибирск: Наука, 1972. 273 с.
- Николаева М.Г. Покой семян и факторы, его контролирующие // Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. М.: Колос, 1982. С. 72–95.
- Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. 348 с.
- ОСТ 56–94–87. Семена древесных пород. Методы рентгенографического анализа. М.: Гослесхоз СССР, 1988.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений М., 1970. 254 с.
- Свинцова В.С., Третьякова И.Н. Цитоэмбриологические особенности ускоренного репродуктивного цикла *Pinus sibirica* (Pinaceae) в условиях интродукции в зоне хвойно-широколиственных лесов // Ботанический журнал. 2014. Т. 99. № 12. С. 1353–1363.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных. Новосибирск: Наука, 1990. 154 с.
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. Особенности инициации эмбрионов из мегагаметофитов *Pinus sibirica* к культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 112–120.
- Третьякова И.Н., Лукина Н.В. Акселерация эмбрионального развития у деревьев *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 1. С. 49–56.
- Третьякова И.Н., Невзоров В.Н., Голубев И.А., Филиппова И.П. Биологическая характеристика семян кедра сибирского разной крупности // Генетика и селекция на службе леса: Материалы международной научно-практической конференции. Воронеж, 1997. С. 349–353.
- Третьякова И.Н., Новоселова Н.В., Череповский Ю.А. Особенности эмбрионального развития у сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) с однолетним циклом развития женской шишки в горах Западного Саяна // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 1. С. 134–141.
- Tretyakova I.N., Shuklina A.S., Park M.E., Yang L., Akhmyarova G.R., Kudoyarova G.R. The role of phytohormones in the induction of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* // Cytologia. 2021. V. 86. № 1. P. 55–60.
- Obrouheva N.V. Germination program in non-dormant seeds: programing saving and implementation // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. № 6.

Biological Properties of the Siberian Pine's Seeds

I. N. Tretyakova*

Forest Institute, Siberian Branch of the RAS, Akademgorodok 50 bldg. 28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

*E-mail: culture@ksc.krasn.ru

A study of the biological properties of the Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) seeds was carried out. Four seed categories were used in the work, differing in size: large (11–14 mm in length), medium (9–10 mm), small (7–8 mm) and very small seeds (<6 mm). The seeds quality study using the X-ray and the histochemical analyses showed that the size of the seeds can indicate their defectiveness. Fractions of small and very small seeds of Siberian pine turned out to be completely sterile, most of the seeds of large and medium fractions were viable. Cytoembryological studies have shown that in trees that form empty and underdeveloped seeds (fractions of medium and large seeds), disturbances in the embryological structures development can be observed. These disturbances take place at the stage of gametophytogenesis and the archegonia development. In trees with large seeds, gametogenesis proceeds without deviations, four archegonia are formed in the ovules, and polyembryonic seeds are formed (up to 16 embryos in the germinal canal). In Siberian pine trees with a one-year reproductive cycle, the seed size varies from very small to large. In these trees, the development of the female gametophyte is completed and archegonia are formed. However, in the ovules of trees with a one-year reproductive cycle, fertilization of eggs does not occur and seeds without an embryo are formed. During the period of stratification (four months), in most seeds of the medium and large fractions the intra-seed, growth of the embryo was completely completed. In *in vitro* culture on MS medium with a low concentration of hormones, the growth of the germinal axis was carried out in seven days of cultivation. The embryos germinated successfully. Thus, based on experiments on the Siberian pine embryos cultivation, it can be concluded that the seeds of this species can enter organic (morphophysiological) dormancy. When creating optimal conditions for germination (nutrient substrat, temperature $24 \pm 1^\circ\text{C}$), Siberian pine seeds are able to germinate.

Keywords: Siberian pine, seeds, stratification, *in vitro* culture, X-ray analysis, histochemical analysis, embryonic structures, organic dormancy.

Acknowledgements: The work has been carried out within the framework of the basic project of the Forest Institute SB RAS-2021–2025 “Functional and dynamic indication of Siberian forests’ biodiversity” No. 0356-2021-0009 and with partial support from the RSF, Krasnoyarsk Territory’s government and the Krasnoyarsk Foundation for scientific and technological activities support within the framework of the scientific project No. 22-14-20008.

REFERENCES

- Danovich K.N., Stroenie i formirovanie semyan (The structure and formation of seeds), In: *Fiziologiya semyan* (Seed physiology), Moscow: Nauka, 1982, pp. 5–44.
- Danovich K.N., Strukturno-funktsional'naya organizatsiya razvitiya semyan khvoynkh (Structural and functional organization of the development of coniferous seeds), In: *Polovaya reproduksiya khvoynkh* (Sexual reproduction of conifers), Proc. of Second All-Union Symposium, Novosibirsk: Nauka, 1985, pp. 8–10.
- Dzhensen U.D., *Botanicheskaya gistokhimiya* (Botanical histochemistry), Moscow: Mir, 1965, 377 p.
- Iroshnikov A.I., Polimorfizm populyatsii kedra sibirskogo (Polymorphism in the Siberian pine populations), In: *Izmenchivost' drevesnykh rastenii Sibiri* (Variability of woody plants of Siberia), Krasnoyarsk: Izd-vo ILiD SO RAN, 1974, pp. 73–103.
- Ivanov V.B., *Aktivnye krasiteli v biologii* (Reactive dyes in biology), Moscow: Nauka, 1982, 214 p.
- Minina E.G., Larionova N.A., *Morfogenez i proyavlenie pola u khvoynkh* (Morphogenesis and sex expression of pines), Moscow: Nauka, 1979, 134 p.
- Nekrasova T.P., *Biologicheskie osnovy semenosheniya kedra sibirskogo* (Biological basis of seed production of Siberian cedar), Novosibirsk: Nauka, 1972, 273 p.
- Nikolaeva M.G., Pokoi semyan i faktory, ego kontroliruyushchie (Seed dormancy and factors controlling it), In: *Fiziologiya i biokhimiya pokoya i prorastaniya semyan* (Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination), Moscow: Kolos, 1982, pp. 72–95.
- Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N., *Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchikhsya semyan* (Handbook on hard seed sprouting), Leningrad: Nauka, 1985, 348 p.
- Obrouheva N.V., Germination program in non-dormant seeds: programing saving and implementation, *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, Vol. 68, No. 6. OST 56-94-87.
- Pausheva Z.P., *Praktikum po tsitologii rastenii* (Practical course of the plant cytology), Moscow: Kolos, 1970, 254 p.
- Svintsova V.S., Tret'yakova I.N., Tsitoembriologicheskie osobennosti uskorennoy reproduktivnoy tsikla *Pinus sibirica* (Pinaceae) v usloviyakh introduktsii v zone khvoynoshirokolistvennykh lesov (Cytoembryological peculiarities of accelerative reproductive cycle *Pinus sibirica* (Pinaceae)

under introduction in zone of coniferous and broad-leaved forests), *Botanicheskii zhurnal*, 2014, Vol. 99, No. 12, pp. 1353–1363.

Tret'yakova I.N., *Embriologiya khvoynykh* (Embryology of conifers), Novosibirsk: Nauka, 1990, 154 p.

Tret'yakova I.N., Lukina N.V., Acceleration of embryonic development of *Pinus sibirica* trees with a one-year reproductive cycle, *Russian Journal of Developmental Biology*, 2016, Vol. 47, No. 1, pp. 41–48.

Tret'yakova I.N., Nevzorov V.N., Golubev I.A., Filippova I.P., Biologicheskaya kharakteristika semyan kedra sibirskogo raznoi krupnosti (Biological characteristics of Siberian stone pine seeds of different sizes), *Genetics and breeding in the service of the forest*, Voronezh, Proc. of International Scientific-practical Conf., Voronezh, pp. 349–353.

Tretyakova I.N., Novoselova N.V., Cherepovskii Y.A., Embryonal development of Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) with the annual cycle of ovulate cone development in the Western Sayan mountains, *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, Vol. 51, No. 1, pp. 120–126.

Tretyakova I.N., Shuklina A.S., Park M.E., Yang L., Akhiyarova G.R., Kudoyarova G.R., The role of phytohormones in the induction of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica* and *Larix sibirica*, *Cytologia*, 2021, Vol. 86, No. 1, pp. 55–60.

Tret'yakova I.N., Voroshilova E.V., Embryo initiation from *Pinus sibirica* megagametophytes in *in vitro* culture, *Russian Journal of Developmental Biology*, 2014, Vol. 45, No. 2, pp. 93–100.