

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

М.Ю. Ишмуратова

к.б.н., профессор, кафедра ботаники,

Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова

E-mail: margarita.ishmur@mail.ru

С.У. Тлеукунова

к.б.н., доцент, кафедра ботаники,

Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова

E-mail: damir--6@mail.ru

Приведены результаты криоконсервации семян иссопа лекарственного, тимьяна Маршаллиевского и чернушки посевной. Оптимизированы тара для замораживания, условия оттаивания, виды и концентрации криопротекторов.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, семена, тимьян Маршаллиевский, чернушка посевная, иссоп лекарственный.

Для цитирования: Ишмуратова М.Ю., Тлеукунова С.У. Разработка методов криоконсервации семян некоторых лекарственных растений. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(10):63–66. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-12>

Одним из современных и наиболее эффективных способов сохранения жизнеспособности семенного материала растений является хранение при сверхкритических низких температурах [1]. Замораживание в жидком азоте или его парах приводит к полной остановке жизнедеятельности, замедлению ферментативной активности, что позволяет сохранять семена очень длительное время без потери показателей всхожести и энергии прорастания [2–4].

В Казахстане в связи с активным развитием производства фармацевтических препаратов на основе растительного сырья, встает вопрос об эффективной организации хранения семенного материала, в том числе путем создания криобанков.

Цель исследования – оптимизация условий криоконсервации семян следующих лекарственных растений: тимьян Маршаллиевский, чернушка посевная, иссоп лекарственный.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2017–2018 гг. на базе лаборатории биотехнологии и молекулярной генетики биолого-географического факультета КарГУ им. Е.А. Букетова.

Семена были собраны на коллекции ботанического сада КарГУ, разделены на партии и заморожены в сосуде Дьюара в жидком азоте при раз-

личных условиях [5, 6]. При выявлении факторов, влияющих на сохранения жизнеспособности, анализировали тару (фольга и криопробирки), условия размораживания (быстрое – на водяной бане при температуре 70 °С; медленное – при комнатной температуре) и применение криопротекторов различной концентрации.

Проращивание семян после размораживания проводили на чашках Петри на 2-слойной фильтровальной бумаге по стандартным методикам [7, 8]. Результаты обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия опытов была посвящена оценке жизнеспособности семенного материала в зависимости от тары, в которой проводили замораживание, и условий размораживания (табл. 1).

Полученные результаты показали, что лучшие показатели всхожести для семян иссопа лекарственного отмечены на фоне замораживания в пластиковой таре и размораживания на водяной бане. Для чернушки посевной всходы в варианте размораживания на водяной бане получить не удалось. При медленном размораживании обе тары дали показатели всхожести выше контроля, но наилучшие результаты получены при замораживании в пластиковой таре. Для тимьяна Маршаллиевского лучшие результаты получены в варианте

Таблица 1. Всхожесть и энергия прорастания семян лекарственных растений в зависимости от тары и условий размораживания

Вид	Тара	Условия размораживания	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %
Иссоп лекарственный	Контроль	–	35,0±0,5	32,5±,8
	Фольга	Быстрое	30,0±0,1	27,5±0,8
	Пластик	Быстрое	47,5±0,5	45,0±0,7
	Фольга	Медленное	35,0±0,4	30,0±0,1
	Пластик	Медленное	25,1±0,9	22,5±0,5
Чернушка посевная	Контроль	–	8,8±0,06	6,3±0,03
	Фольга	Быстрое	–	–
	Пластик	Быстрое	–	–
	Фольга	Медленное	12,5±0,05	10,0±0,08
	Пластик	Медленное	31,4±0,2	25,4±0,4
Тимьян Маршаллиевский	Контроль	–	12,5±0,2	8,5±0,1
	Фольга	Быстрое	56,4±1,3	40,8±0,6
	Пластик	Быстрое	12,6±0,3	10,0±0,2
	Фольга	Медленное	60,2±1,5	55,4±1,8
	Пластик	Медленное	48,5±0,9	42,1±0,6

применения тары из фольги и при медленном способе оттаивания.

Во второй серии опытов были проанализированы показатели всхожести семян после криоконсервации с использованием криопротекторов. Известно, что существует ряд химических веществ (высшие спирты, полимерные соединения, моно-, ди- и полисахариды и т.д.), которые обладают защитным действием при воздействии низких температур [9]. Данные вещества способны переводить свободную воду в связанное состояние, препятствовать образованию кристаллов льда, а также могут встраиваться в структуру клеточных мембран, повышая их прочность.

Результаты показали, что семена различных видов лекарственных растений по-разному реагируют на применение криопротекторов (табл. 2).

Лучшие результаты получены для семян иссопа лекарственного в варианте опыта с применением глюкозы 40% в качестве криопротектора. Всхожесть семян в данном варианте опыта составила 45%, в энергия прорастания 37,5%, что выше контрольных значений на 10 и 5% соответственно. Для чернушки посевной все варианты опытов с применением криопротекторов оказались ниже контрольных значений в 2–2,5 раза; что свидетельствует о нецелесообразности применения при криоконсервации семян данного вида. Всхожесть тимьяна Маршаллиевского значительно колебалась в зависимости от применяемых криопротекторов. Оптимальным криопротектором определен глицерин в концентрации 20%, так как всхожесть с его применением в опыте составила 80%, что почти на 20% превышает контрольные значения.

Таблица 2. Всхожесть и энергия прорастания семян лекарственных растений в зависимости от применения криопротекторов при замораживании в жидком азоте

Криопротектор, концентрация	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %
<i>Иссоп лекарственный</i>		
Контроль (без криопротекторов)	35,0±0,5	32,5±,8
Глицерин 40%	17,5±0,5	15,0±0,8
Глицерин 20%	25,0±0,3	22,1±0,2
Полиэтиленгликоль 40%	32,5±0,5	30,0±0,1
Полиэтиленгликоль 20%	32,5±0,5	28,0±0,4
Сахароза 40%	35,0±0,9	27,5±0,3
Сахароза 20%	10,0±0,1	5,5±0,06
Глюкоза 40%	45,0±0,5	37,5±0,6
Глюкоза 20%	17,5±0,2	10,0±0,1
ДМСО 3%	22,5±0,4	18,5±0,3
ДМСО 5%	25,1±0,3	22,6±0,4
ДМСО 10%	27,5±0,2	24,1±0,4
<i>Чернушка лекарственная</i>		
Контроль (без криопротекторов)	39,5±0,4	30,5±0,6
Глюкоза 20%	16,5±0,4	12,0±0,1
Сахароза 20%	18,4±0,2	15,0±0,1
Глицерин 20%	21,5±0,5	19,3±0,2
Полипропиленгликоль 20%	–	–
<i>Тимьян Маршаллиевский</i>		
Контроль (без криопротекторов)	60,2±1,5	55,4±1,8
Глицерин 20%	80,0±3,2	68,4±1,9
Сахароза 5% + пропиленгликоль 5%	5,0±0,05	5,0±0,05
Сахароза 5% + глицерин 5%	35,0±0,4	28,4±0,2
Фруктоза 5% + глицерин 5%	50,5±1,6	44,8±1,1
Фруктоза 5% + пропиленгликоль 5%	–	–
Глюкоза 10% + глицерин 10%	50,0±1,1	42,0±0,6
Сахароза 10% + пропиленгликоль 10%	–	–
Сахароза 10% + глюкоза 10%	10,0±0,1	8,5±0,01
Пропиленгликоль 1%	5,2±0,05	3,5±0,04
Глюкоза 5% + пропиленгликоль 5%	10,3±0,1	7,3±0,1
Глюкоза 20%	–	–
ДМСО 5%	–	–

ВЫВОДЫ

1. Семенной материал исследованных лекарственных растений успешно переживает замораживание в жидком азоте, сохраняя всхожесть и энергию прорастания.
2. Наилучшей тарой для криозамораживания для семян иссопа лекарственного и чернушки посевной является пластиковая, для тимьяна Маршаллиевского – фольга.
3. Размораживание семян иссопа лекарственного необходимо вести на водяной бане, семян чернушки посевной и тимьяна Маршаллиевского – при комнатной температуре.
4. При криоконсервации семян иссопа лекарственного целесообразно применять криопротектор в виде глюкозы 40%, семян тимьяна Маршаллиевского – глицерин 20%, а замораживание семян чернушки посевной лучше вести без применения криопротекторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kholina A.B., Voronkova N.M.* Seed Cryopreservation of Some Medicinal Legumes // *Botanical Studies*. 2013. Т. 54. № 33. Р. 122–131.
2. *Жимулев И.Ф.* Криохранение семян: итоги и перспективы. Новосибирск. Изд-во СО РАН. 2014. 112 с.
3. *Розанов С.И.* Место генетических криобанков в решении проблемы сохранения биоразнообразия // *Биофизика живой клетки*. 1994. № 6. С. 8–16.
4. *Wu Y., Engelmann F., Zhao Y., Zhou M., Chen S.* Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants // *CryoLetters*. 1999. № 20. Р. 121–130.
5. *Додонова А.Ш., Гаврилькова Е.А., Ишмуратова М.Ю., Тлеуженова С.У.* Рекомендации по криоконсервации семенного материала лекарственных и эндемичных видов растений: Справочное издание. Караганда: ТОО «Полиграфист». 2017. 76 с.
6. *Sakai A.* Development of cryopreservation techniques. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Rome: Tsukuba & IPGRI. 2000. 215 p.
7. *Basra A.S.* Hndbook of seed science and technology. Binghamton: Haworth Press, 2006. 235 p.
8. *Кушнаренко С.В., Мухтудинова З.Р., Аралбаева М.М.* Криоконсервация семян: методические рекомендации. Алматы: Изд-во Ин-та биологии и биотехнологии растений, 2011. 33 с.
9. *Matsumoto T., Sakai A., Nako Y.* A novel precutting for enhancing the survival of in vitro grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to –196 °C by vitrification // *CryoLetters*. 1998. № 19. Р. 27–36.

Поступила 13 августа 2018 г.

THE DEVELOPMENT OF METHODS OF CRYO CONSERVATION OF SEED OF SOME HERBS

© M.Yu. Ishmuratova, S.U. Tleukenova, 2018

M.Yu. Ishmuratova

Ph.D. (Biol.), Professor, Department of Botany,
Karaganda State University named after Academician Ye.A. Buketov
E-mail: margarita.ishmur@mail.ru

S.U. Tleukenova

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Botany,
Karaganda State University named after Academician Ye.A. Buketov
E-mail: damir--6@mail.ru

At the article results of studying of a cryo conservation of seeds of *Hyssopus officinalis*, *Thymus marschallianus* and *Nigella sativa* are considered. Within the researches optimization of a container for a cryo preservation, conditions of defrosting, kind and concentration of cryo protectors are performed. Results have shown that freezing of *Hyssopus officinalis*' seeds at extra critical low temperatures needs to be carried out in a plastic container with defrosting on a water bath. For *Nigella sativa* the optimum conditions of cryo preservation with the maximum storage of seed viability are the plastic container and slow defrosting at the room temperature.

The best results for seeds of *Tymus marschallianus* are revealed using a container from a foil and slow defrosting at the room temperature. Use of cryo protectors hasn't allowed receiving identical results for seeds of herbs. So, the optimum cryo protector for seeds of *Hyssopus officinalis* has determined glucose in concentration of 40%, for seeds of *Thymus marschallianus* – glycerin in concentration of 20%.

Application of cryo protectors for seeds of *Nigella sativa* is low-resulted. So, germination in all variants of experience has appeared below control. Therefore application of cryo protectors for *Nigella sativa*' seeds is not expedient.

Key words: cryo conservation, cryo protector, seeds, *Thymus marschallianus*, *Nigella sativa*, *Hyssopus officinalis*.

For citation: Ishmuratova M.Yu., Tleukenova S.U. The development of methods of cryo conservation of seed of some herbs. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(10):63–66. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-12>

REFERENCES

1. Kholina A.B., Voronkova N.M. Seed Cryopreservation of Some Medicinal Legumes // Botanical Studies. 2013. T. 54. № 33. P. 122–131.
2. Zhimulev I.F. Kriohranenie semjan: itogi i perspektivy. Novosibirsk. Izd-vo SO RAN. 2014. 112 s.
3. Rozanov S.I. Mesto geneticheskikh kriobankov v reshenii problemy sohraneniya bioraznoobraziya // Biofizika zhivoj kletki. 1994. № 6. S. 8–16.
4. Wu Y., Engelmann F., Zhao Y., Zhou M., Chen S. Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants // Cryo-Letters. 1999. № 20. P. 121–130.
5. Dodonova A.Sh., Gavril'kova E.A., Ishmuratova M.Yu., Tleukenova S.U. Rekomendacii po kriokonservacii semennogo materiala lekarstvennyh i endemichnyh vidov rastenij: Spravochnoe izdanie. Karaganda: TOO «Poligrafist». 2017. 76 s.
6. Sakai A. Development of cryopreservation techniques. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Rome: Tsukuba & IPGRI. 2000. 215 p.
7. Basra A.S. Handbook of seed science and technology. – Binghamton: Haworth Press, 2006. 235 p.
8. Kushnarenko S.V., Muhitdinova Z.R., Aralbaeva M.M. Kriokonservacija semjan: metodicheskie rekomendacii. Almaty: Izd-vo In-ta biologii i biotekhnologii rastenij, 2011. 33 s.
9. Matsumoto T., Sakai A., Nako Y. A novel precutting for enhancing the survival of in vitro grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to –196 °C by vitrification // CryoLetters. 1998. № 19. P. 27–36.