

**Biological Sciences****Биологические науки**

UDC 57.084.1

**Drug Plant Seed Viability Preservation by Cryoconservation**<sup>1</sup>Alexandra Sh. Dodonova<sup>2</sup>Helen A. Gavrill'kova<sup>3</sup>Margaret Yu. Ishmuratova<sup>4</sup>Saltanat U. Tleukenova<sup>1-4</sup> Karaganda State University named on E.A.Buketov, Kazakhstan<sup>1</sup> PhD (Biology)

E-mail: sasha\_dodonova1@mail.ru

<sup>2</sup> Senior Lecturer<sup>3</sup> PhD (Biology)<sup>4</sup> PhD (Biology)

**Abstract.** The article considers the possibility of cryopreservation of seeds of several species of drug plants in Central Kazakhstan – *Tanacetum ulutavicum*, *Niedzwedzka semiretschenskia*, *Rhaponticum carthamoides*. To increase the amount of viable seeds after liquid nitrogen freezing, we used different defrosting temperatures, deposited seeds with different moisture contents and used different containers for cryopreservation. Recommendations, concerning conditions of cryopreservation of seeds of these drug plant species were developed, basing on the obtained results.

**Keywords:** Cryoconservation; *Tanacetum ulutavicum*; *Niedzwedzka semiretschenskia*; *Rhaponticum carthamoides*; defrosting temperature; seed humidity.

**Введение.** Сохранение семенного материала лекарственных растений, особенно тех видов, которые являются эндемиками, представляется важной задачей. Следует отметить, что хранение семян при комнатной температуре приводит к снижению их всхожести из-за накопления мутаций и повреждения зародыша. В настоящее время перспективным методом хранения геномов растений считается глубокое замораживание семян (до температуры жидкого азота), что теоретически позволяет сохранять всхожесть и генетическую полноценность семян неограниченное время. До настоящего времени метод криоконсервации семян видов флоры Центрального Казахстана не применялся, и не изучалась толерантность семян к замораживанию в жидком азоте, что и определило выбор темы нашего исследования. Ряд исследователей изучали влияние криоконсервации семян растений разных видов, принадлежащих к различным семействам, на лабораторную и полевую всхожесть, а также на дальнейший рост и развитие и выявили видоспецифичность реакции семян на глубокое замораживание. Также на сохранение жизнеспособности семян оказывает влияние влажность семян, температура оттаивания, а также тара, в которой проводится замораживание [1-5].

Эндемичные и редкие лекарственные растения – это наиболее подходящие кандидаты для сохранения при сверхнизких температурах, так как ограниченные ареалы распространения определяют эти виды в группу риска.

*Niedzwedzka semiretschenskia* В. Fedtsch. – редкий вид. Реликтовый узколокальный эндемик Чу-Илийских гор, представитель монотипного рода. Декоративен. Используется в народной медицине. Распространен в Южном Казахстане, на западных склонах Чу-Илийских гор, на возвышенности Анархай (в верховьях Копалысай), в урочищах Айдерке и Ащису, лежащих восточнее Анархая. Включен в Красную книгу МСОП.

*Tanacetum ulutavicum* Tzvel. – многолетнее растение, эндемик, встречающийся только по скалам и каменистым склонам гор Улытау. Сумма флавоноидов из соцветий обладает желчегонным действием.

*Rhaponticum carthamoides* – эндемик Южной Сибири. Основные места обитания находятся на Алтае и в Саянах. Произрастает на субальпийских, реже альпийских лугах (на высоте 1400–2300 м над уровнем моря). Основные действующие вещества (экдистерон и их аналоги экдистероиды), обладают анаболическим эффектом и перспективны для спорта, животноводства и медицины.

**Материалы и методы.** Контрольную всхожесть семян определяли, проращивая по 50 штук в трех повторностях на увлажненной фильтровальной бумаге в чашках Петри при комнатной температуре. Для экспериментов специально семена не отбирали, отбраковывали только поврежденные, с измененной окраской или пустые. Семена *Rhaponticum carthamoides* очищали от плодной шелухи, а у *Tanacetum ulutavicum* этого не делали из-за очень мелких размеров.

Замораживание семян проводили в конвертах из алюминиевой фольги путем погружения в жидкий азот на 30 минут. Размораживали на воздухе при комнатной температуре, на водяной бане 90 °С, а также с трехдневной отсрочкой посева после замораживания.

**Результаты и их обсуждение.** Контрольная всхожесть семян исследуемых видов составила  $33\pm 1\%$  у пижмы улытауской,  $10\pm 0,2\%$  у левзеи сафлоровидной. Семена недзвецкии семиреченской всходов не дали.

Для увеличения всхожести левзеи сафлоровидной и недзвецкии семиреченской провели холодovou стратификацию семян, поместив их на 1 и 3 суток в холодильную камеру с температурой  $-20^{\circ}\text{C}$ . Результаты представлены на рисунке 2. Стратификация в течение одних суток привела к повышению всхожести у левзеи сафлоровидной до  $40\pm 0,3\%$ , т.е. больше чем в контроле на 30%, недзвецкии семиреченской – до  $10\pm 0,3\%$ , увеличение по сравнению с контролем 10%. Более длительная (в течение 3-х суток) стратификация не изменяла уровень всхожести семян по сравнению с контрольной.

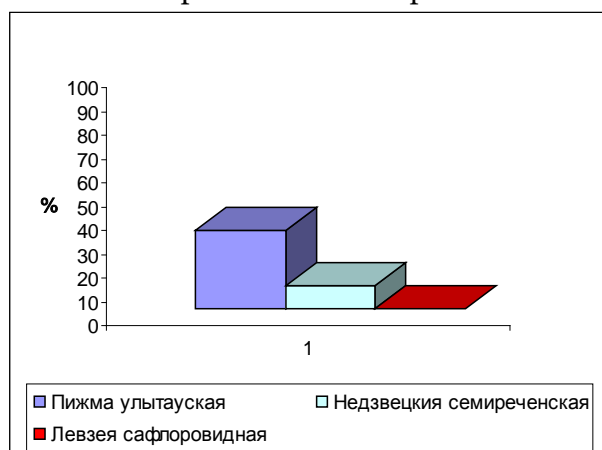


Рис. 1. Контрольная всхожесть семян растений изучаемых видов

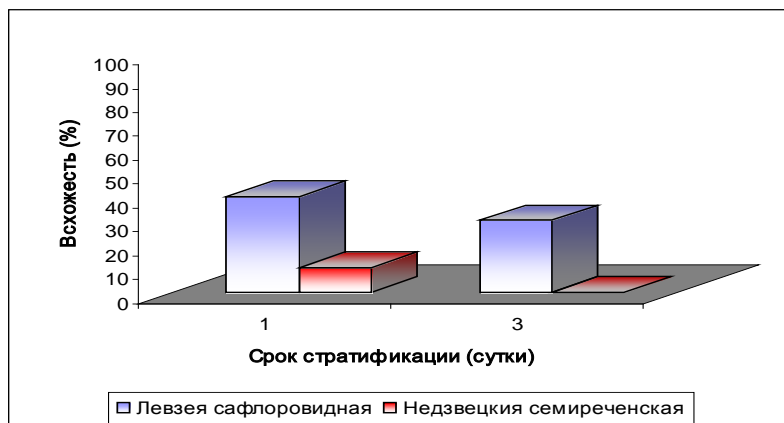


Рис. 2. Определение всхожести семян левзеи сафлоровидной и недзвецкии семиреченской после холодной стратификации

Замораживание семян проводили в конвертах из алюминиевой фольги путем погружения в жидкий азот, размораживали на воздухе при комнатной температуре, на водяной бане 80 °С, а также с трехдневной отсрочкой посева после замораживания. В эксперименте использовали по 50 семян в трех повторностях. Полученные результаты представлены на рисунке 3.

Семена пижмы улытауской продемонстрировали лучшую всхожесть при медленном оттаивании при комнатной температуре – 41±1%. Однако оттаивание семян после криообработки в горячей водяной бане, или посев с трехсуточной отсрочкой способствовали значительному снижению уровня всхожести семян пижмы улытауской в сравнении с контрольной 3,4±0,1% и 0% соответственно.

Напротив, семена левзеи сафлоровидной показали наилучшее сохранение жизнеспособности именно при посеве с отсрочкой – 25±0,8%, при оттаивании на водяной бане - 16±0,8%. Семена левзеи сафлоровидной медленно оттаивающие после криообработки при комнатной температуре не взошли.

Недзвецкия семиреченская лучшую всхожесть семян показала при быстром оттаивании на водяной бане – 16±1%, меньшую – при посеве с отсрочкой – 10±1%, а при медленном оттаивании – 4±0,3%.

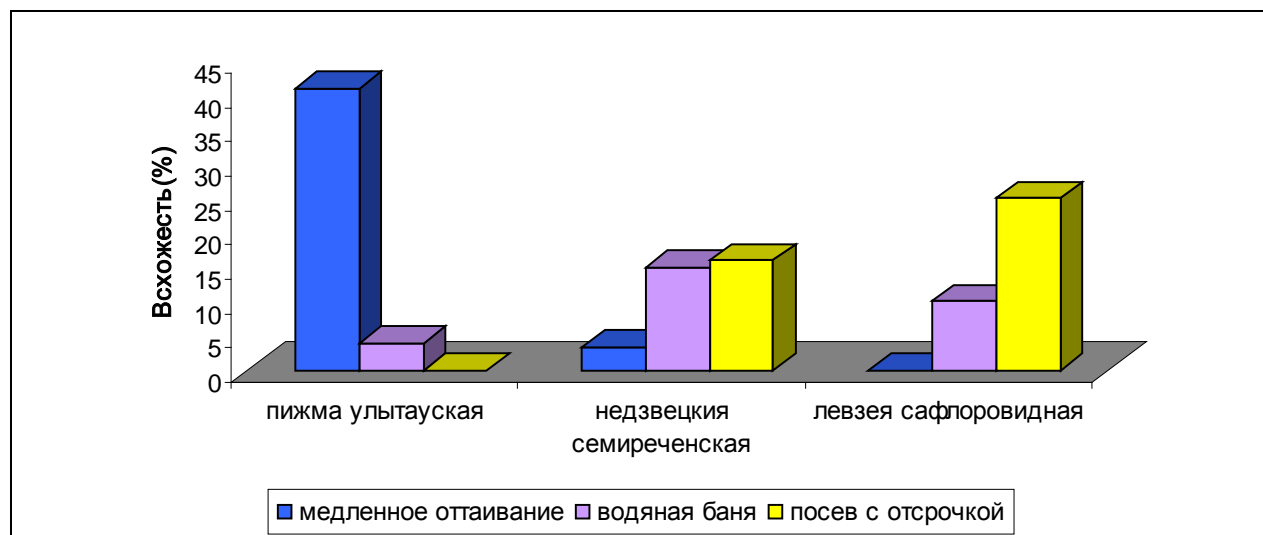
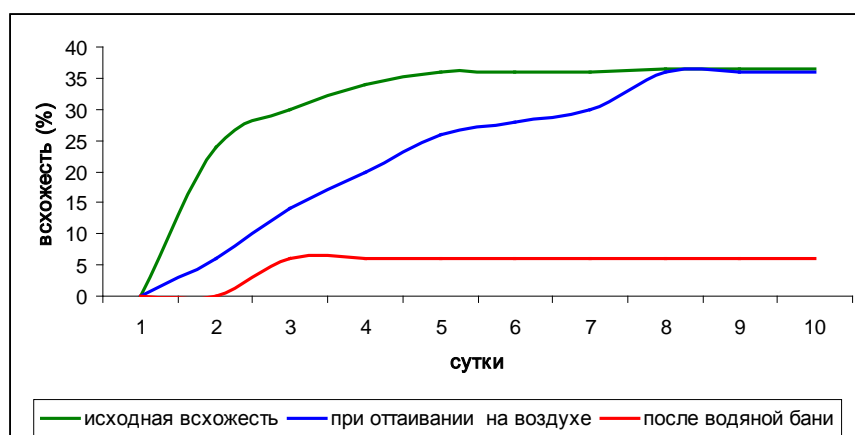


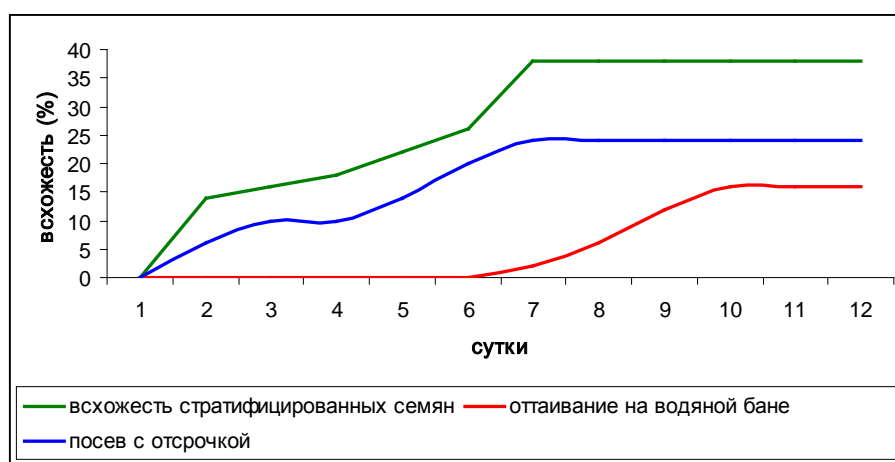
Рис. 3. Влияние температуры и скорости оттаивания на всхожесть семян после замораживания при сверхнизких температурах

Динамика прорастания семян всех видов изучаемых растений не имела значительных отличий после криоконсервации и различным способе оттаивания. Не изменялись сроки прорастания, и характер кривой. Однако, следует отметить, что семена левзеи сафлоровидной после криоконсервации и быстрого оттаивания на водяной бане дали первые всходы только на 6 день, в отличие от контроля и посева с отсрочкой, где первые проростки появляются через день после посева; а семена пижмы улытауской после быстрого оттаивания имели всхожесть менее 5 %. Период прорастания составил у всех изучаемых видов лекарственных растений около 10 дней, что соответствует обычным срокам.

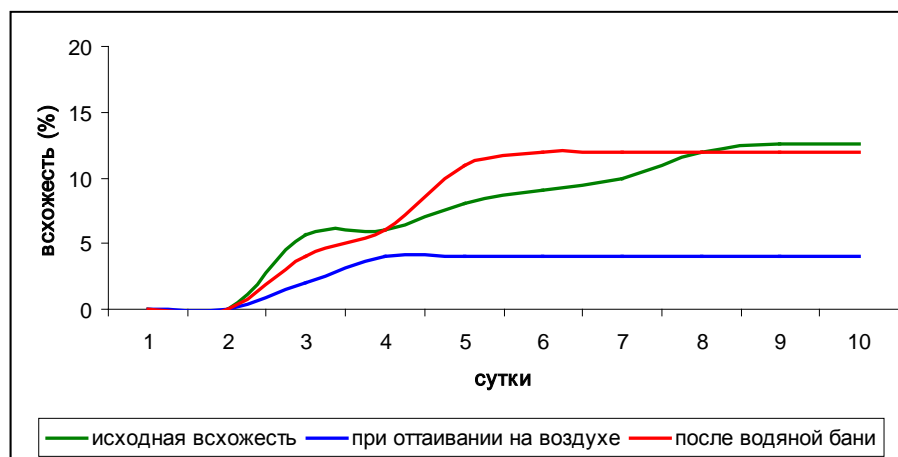
Литературные данные свидетельствуют о том, что важнейшим фактором, влияющим на сохранение жизнеспособности семян при криоконсервации является их влажность, оптимальные значения – 5-6%. Нами были проведены эксперименты по замораживанию в жидком азоте семян с различным содержанием влаги: пижмы улытауской (14%, 7%), левзеи сафлоровидной (10%, 1%) и недзвецкии семиреченской (11%, 2%). На приведенной ниже диаграмме (рисунок 5) мы условно называем семена с более высокой влажностью - «влажность > 10%», а семена с меньшим содержанием воды - «влажность < 7%».



А



Б



В

Рис. 4. Динамика прорастания семян пижмы улытауской (А), левзеи сафлоровидной (Б) и недзвецкии семиреченской (В) в контроле, после криообработки при оттаивании на воздухе и на водяной бане

Несмотря на двух и пятикратную разницу в содержании воды в семенах пижмы улытауской и недзвецкии семиреченской, достоверных отличий в сохранении жизнеспособности после криоконсервации не наблюдали. Вероятно, это связано с мелкими размерами семян – вес 1000 семян пижмы улытауской составляет  $0,33 \pm 0,02$  г, а недзвецкии семиреченской –  $3,52 \pm 0,8$  г; а также с тем, что разброс содержания воды в семенах в пределах одной группы достаточно велик.

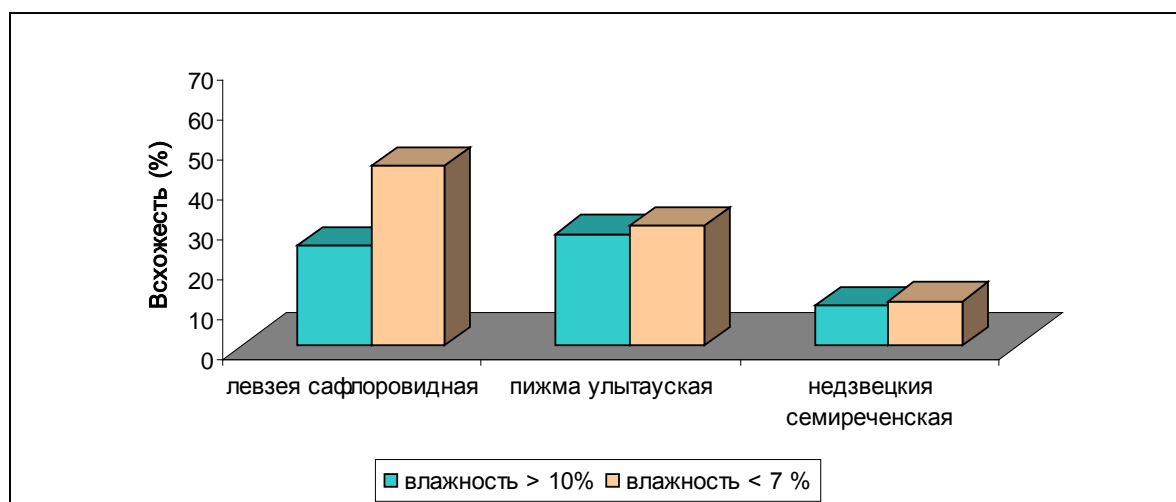


Рис. 5. Зависимость всхожести семян после криоконсервации от содержания в них влаги

Семена левзеи более крупные – вес 1000 семян –  $11,48 \pm 0,3\text{г}$ , с меньшими различиями в размерах. Замораживание в жидком азоте семян левзеи сафлоровидной с содержанием влаги 1% привело к лучшему сохранению жизнеспособности – взошли 45% семян, а после криоконсервации семян с влажностью 10% получили 25% всходов. Это подтверждает литературные данные о том, что семена с меньшим содержанием влаги лучше переносят экстремально низкие температуры.

Кроме того, что для наилучшего сохранения жизнеспособности семян при криоконсервации имеет значение температура и скорость оттаивания, содержание влаги в депонируемом материале, в литературе упоминается влияние на выживаемость биологического материала тара, в которой осуществляют замораживание в жидком азоте. Мы в экспериментах использовали алюминиевую фольгу, упоминающуюся прежде, а также тканевые мешочки и пластиковые пробирки. Из представленной ниже диаграммы (рисунок 6) видно, что тканевые мешочки показали наихудший результат сохранения жизнеспособности при криоконсервации у всех изучаемых видов семян. Для семян *Rhaponticum carthamoides* лучше подходит пластиковая тара, а для семян *Tanacetum ulutavicum* и *Niedzwedzia semiretshenskia* лучшие результаты сохранения исходного уровня всхожести продемонстрировало использование конвертиков из алюминиевой фольги.

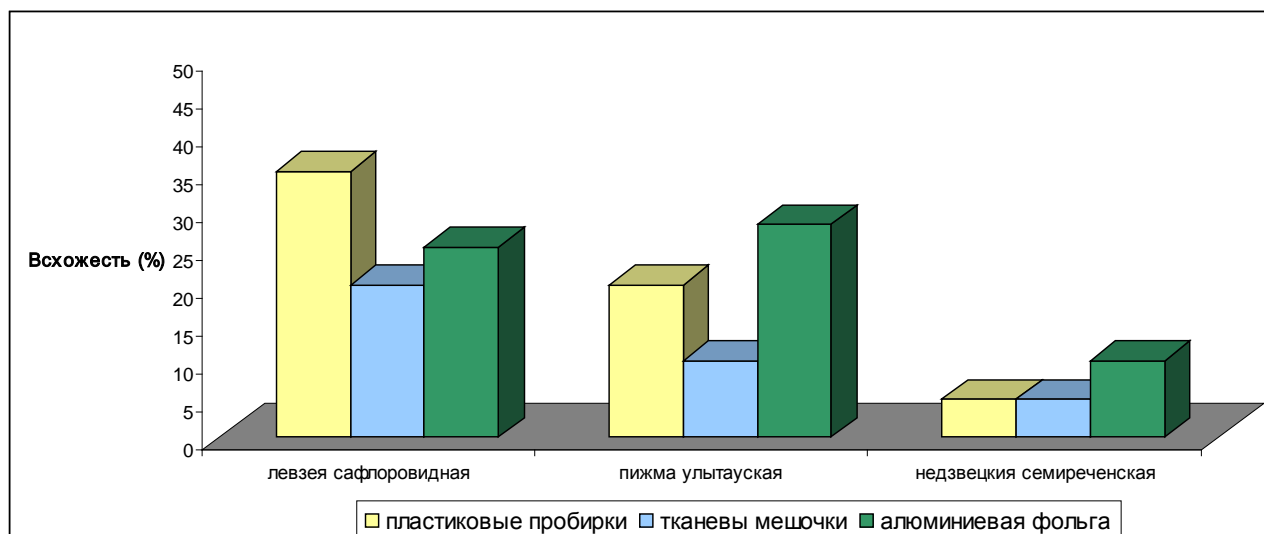


Рис. 6. Зависимость сохранения жизнеспособности семян лекарственных растений при замораживании в жидком азоте от тары

**Выводы.** Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы. При криоконсервации семян *Rhaponticum carthamoides* рекомендуется использовать семена с влажностью менее 5%, пластиковую тару, а после депонирования производить медленное оттаивание при комнатной температуре и посев с отсрочкой. При сохранении в жидком азоте семян *Tanacetum ulutavicum* предпочтительно использование конвертов из алюминиевой фольги, медленное оттаивание при комнатной температуре. Влажность семян пижмы ульятауской не оказала достоверного влияния на сохранение их исходной жизнеспособности при криоконсервации. Для лучшего сохранения всхожести семян *Niedzwedzka semiretschenskia* при криоконсервации рекомендуется помещать семена в конверты из алюминиевой фольги; оттаивание проводить быстрое на водяной бане с температурой 90°C. Влажность семян недзвецкии семиреченской не оказывает значимого влияния на степень сохранения их жизнеспособности.

**Примечания:**

1. Нестерова С.В. Криоконсервация семян дикорастущих растений Приморского края: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.32: Владивосток, 2004 150 с. РГБ ОД, 61:04-3/1495
2. Сафина Г.Ф., Бурмистров Л.А. Низкотемпературное и криогенное хранение семян груши *Pyrus L.* Цитология, 2004, № 46(10). С. 851.
3. Никишина Т.В., Попов А.С., Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Широков А.И., Коломейцева Г.Л. (2007) Криоконсервация семян орхидей. Вестник ТвГУ. Серия: Биология и экология (4). С. 38-43. ISSN 1995-0160
4. Тихонова В.П., Яшина С.Г., Шабаева Э.В. Изучение роста и развития дикорастущих травянистых растений из семян, прошедших криоконсервацию. Биофизика живой клетки, 1994, 6: 86-90.
5. Genebank Standards. FAO/IPGRI. Rome, 1994.

УДК 57.084.1

**Сохранение жизнеспособности семян лекарственных растений при криоконсервации**

Александра Шавкатовна Додонова  
Елена Анатольевна Гаврилькова  
Маргарита Юлаевна Ишмуратова  
Салтанат Ушкempiровна Тлеукунова

<sup>1-4</sup> Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова, Казахстан 100028, Карагандинская область, г. Караганда, ул. Университетская 28

<sup>1</sup> Кандидат биологических наук, доцент  
E-mail: sasha\_dodonoval@mail.ru

<sup>2</sup> Старший преподаватель

<sup>3</sup> Кандидат биологических наук, доцент

<sup>4</sup> Кандидат биологических наук, доцент

**Аннотация.** В статье рассматривается возможность криоконсервации семян нескольких видов лекарственных растений Центрального Казахстана - *Tanacetum ulutavicum*, *Niedzwedzka semiretschenskia*, *Rhaponticum carthamoides*. Для увеличения доли семян, сохраняющих свою жизнеспособность после замораживания в жидком азоте использовали различные температуры оттаивания, депонировали семена с различным содержанием влаги в семенах, а также использовали при криоконсервации различные тары. На основании полученных результатов сделаны рекомендации по условиям криоконсервации семян данных видов лекарственных растений.

**Ключевые слова:** Криоконсервация; *Tanacetum ulutavicum*; *Niedzwedzka semiretschenskia*; *Rhaponticum carthamoides*; температура оттаивания; влажность семян.