

Е.А.Гаврилькова¹, А.Ш.Додонова¹, В.Г.Вержук²,
А.В.Павлов², М.Ю.Ишмуратова¹, С.У.Глеуконова¹

¹Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова;

²Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова, Санкт-Петербург, Россия
(E-mail: elena_2809@mail.ru)

Низкотемпературное хранение семенного материала *Peganum harmala*

В статье рассмотрены различные способы низкотемпературного хранения семенного материала *Peganum harmala*. Изучена степень сохранения жизнеспособности семян по уровню всхожести и энергии прорастания. Быстрое замораживание семян в пластиковой таре с криопротектором глицерином путем погружения в жидкий азот и последующего медленного оттаивания на воздухе приводит даже к увеличению уровня всхожести по сравнению с контрольной. Замораживание без криопротекторов, а также использование двухступенчатого программного замораживания способствуют сохранению изучаемых показателей прорастания семян на уровне, сравнимом с исходными. Таким образом, предлагаемые способы низкотемпературного хранения позволят депонировать семена *Peganum garmala* неограниченное время без вреда для зародыша семени и потери показателей всхожести и энергии прорастания, что, в свою очередь, даст возможность ввести данный вид лекарственного растения в коллекцию генетического разнообразия.

Ключевые слова: *Peganum harmala*, семенной материал, криоконсервация.

Актуальность

Изучение биологии прорастания и способов хранения видов, имеющих лекарственное значение, в настоящее время имеет важное практическое значение для сохранения и восстановления естественных популяций, а также обеспечения запасами растительного сырья фармацевтической промышленности Казахстана. Сохранение семенного материала лекарственных растений является актуальной 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. Рассмотрение влияния экстремально низких температур на биологию прорастания семян является, на наш взгляд, актуальной задачей, тем более, что практически отсутствуют исследования по биологии прорастания семенного материала гармалы обыкновенной в норме и после криоконсервации.

Гармала обыкновенная (*Peganum harmala* L., сем. Zygophyllaceae) — многолетнее травянистое растение высотой до 50 см, произрастающее повсеместно в равнинных районах, исключая высокогорья, но значительные заросли встречаются только на территории Южного Казахстана.

Гармала является ценным лекарственным растением, так как содержит значительное количество алкалоидов, производные хиназолина и индола: в корнях в количестве 1,7–3,3 %, в стеблях — 0,23–3,57 %, в листьях — 1,07–4,96 %, в цветках — 2,82 %, в коробочках плодов — 1,08 %, в семенах — 2,38–4,59 %. Из гармалы выделены следующие алкалоиды: гармалин, гармин (банистерин), гармалол и L-пеганин (вазидин), пегамин, пеганол, оксодезоксипеганин, пеганидин (в траве) и др. В семенах содержатся красное красящее вещество и высыхающее жирное масло, в вегетативных надземных органах — белок (24 %), жирное масло (13–25 %), в котором есть линоленовая кислота, α-каротин, β-каротин, и экстрактивные вещества (31 %). В научной литературе [1] описаны фармакологические свойства: гомеопатические, антиспастические, снотворные, противорвотные, противоглистные, мочегонные, потогонные, возбуждающие и успокаивающие ЦНС, обезболивающие, противовоспалительные, антисептические. Сырьё используют для получения препарата дезоксипеганина гидрохлорида, обладающего антихолинэстеразным действием. Препарат гармалы применяют при поражениях периферической нервной системы, простудных заболеваниях, невралгии, нервных и эпилептических припадках, малярии, лихорадке, сифилисе, ревматизме, кожных заболеваниях, катаракте, заболеваниях суставов, заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Для лечения паркинсонизма, последствий эпидемического энцефалита алкалоиды гармин или пеганин применяют внутрь или подкожно.

Объекты и методика исследований

Объектом исследования являлся семенной материал *Peganum harmala* — Гармалы обыкновенной из сем. *Zygophyllaceae* — Парнолистниковые, собранный в 2013 г.

Исследование всхожести и энергии прорастания семян осуществляли по методическим указаниям М.С.Зориной и С.П.Кабанова [2], М.В.Мальцевой [3].

В лабораторных условиях семена проращивали в чашках Петри в 4-кратной повторности на 2-х слоях фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. Семена предварительно дезинфицировали 0,5 %-ным $KMnO_4$ и раствором хлора. Чашки Петри с семенным материалом помещали в климатическую камеру при температуре +24 °С. Для экспериментов специально семена не отбирали, отбраковывали только поврежденные, с измененной окраской или пустые.

Статистическую обработку результатов вели по методике Н.Л.Удольской [4].

Замораживание семян проводили двумя способами. Семена постепенно охлаждали до температуры $-(48-50)^\circ C$ в замораживателе SanyoMedikalFreezer, модель MDF-U442(T), двухступенчатым методом с начальным интервалом 1–2 °С в полчаса до температуры $-30^\circ C$. Во второй ступени охлаждения скорость замораживания увеличивали до 4–5 °С в полчаса и доводили до температуры $-50^\circ C$, после чего семена помещали в большие криотанки на хранение в парах азота при $-(183-185)^\circ C$ [5]. Кроме того, использовали быстрое замораживание погружением семян в различных тарах непосредственно в жидкий азот, температура $-196^\circ C$ [6–8].

Результаты и их обсуждение

У свежесобранных семян гармалы обыкновенной всхожесть составила $75\pm 0,2\%$. Для выбора оптимальных условий низкотемпературного хранения семенной материал был помещен в различные температурные условия ($-20^\circ C$, $-185^\circ C$, $-196^\circ C$) и тары хранения (стеклянную, пластиковую, тканевую и бумажную). Была изучена выживаемость семян после быстрого и программного замораживания.

У семян, сохраняемых при температуре $-20^\circ C$, показатели энергии прорастания и всхожести оказались наилучшими после 12 месяцев хранения — 62 и 61,3 % соответственно (рис. 1, табл. 1). Улучшение показателей всхожести семенного материала гармалы обыкновенной к 12 месяцам хранения объясняется эффектом стратификации.

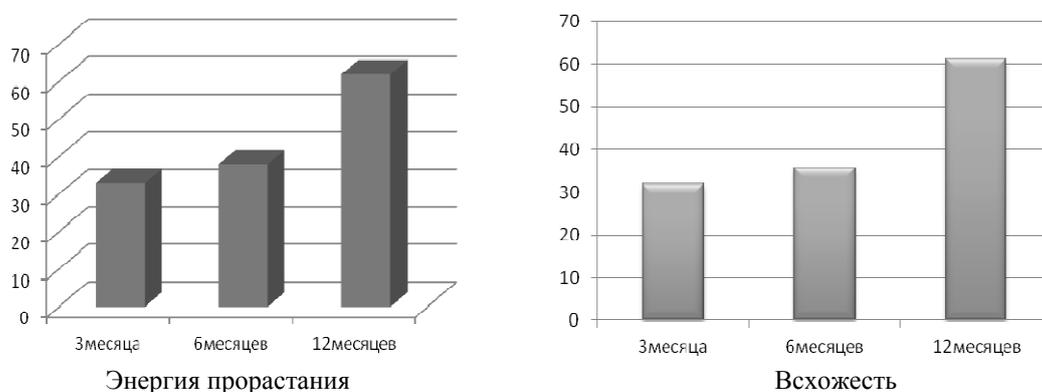


Рисунок 1. Всхожесть и энергия прорастания семян *Peganum garmala*, сохраняемых при температуре $-20^\circ C$

Т а б л и ц а 1

Всхожесть и энергия прорастания семенного материала *Peganum garmala*, хранимого при температуре $-20^\circ C$

Показатель	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Энергия прорастания, %	33±0,5	38±0,7	62±0,8
Всхожесть, %	32±1,2	35,6±0,5	61,3±0,7

Была проведена серия опытов по замораживанию семенного материала исследуемого вида. Семена гармалы обыкновенной в различной таре: тканевые мешочки, пластиковые пробирки (криопробирки марки «Nunc»), конверты из фольги, погружены в жидкий азот ($-196^\circ C$). Оттаивание семян

осуществляли различными способами — медленно, при комнатной температуре; быстро, на водяной бане с температурой 80 °С; применяли посев с двухдневной отсрочкой после оттаивания на воздухе.

Лучшие показатели всхожести и энергии прорастания после криоконсервации продемонстрировали семена, замораживаемые в пластике и быстро размороженные на водяной бане — 57,2 и 60 % соответственно (рис. 2–4, табл. 2). Быстрый способ оттаивания для семян гармалы обыкновенной является лучшим вариантом при использовании любой тары — около 50 %. Оттаивание на воздухе и посев с отсрочкой приводят к низкому сохранению жизнеспособности семян исследуемого вида — от 10 до 35 %.

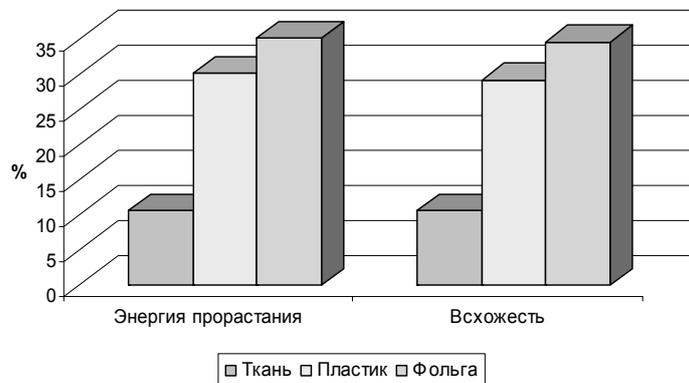


Рисунок 2. Прорастание размороженных, медленно оттаивающих на воздухе семян *Peganum harmala*

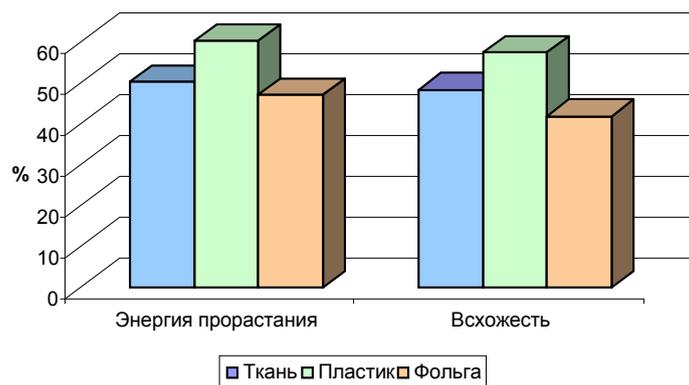


Рисунок 3. Прорастание семян *Peganum harmala* после быстрого размораживания на водяной бане

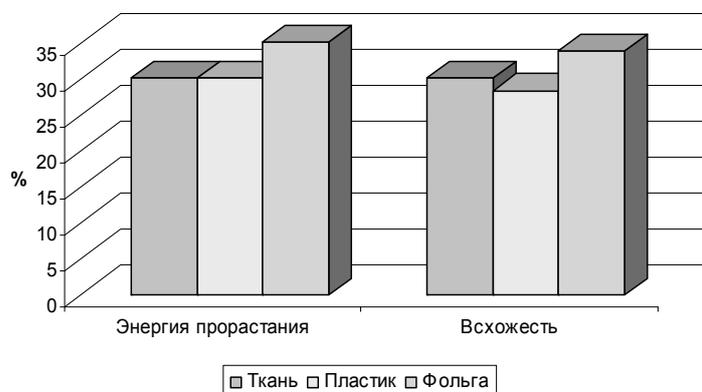


Рисунок 4. Прорастание семян *Peganum harmala* с двухдневной отсрочкой после оттаивания

Так как показатели всхожести и энергии прорастания семян гармалы обыкновенной после криоконсервации оказались ниже контрольных показателей, было проведено замораживание с использованием криопротектора (глицерин) в пластиковой таре. В результате данного эксперимента изучае-

мые показатели значительно улучшились и составили: $85\pm 0,9\%$ — всхожесть и $90\pm 1,0\%$ — энергия прорастания при медленном оттаивании на воздухе (табл. 2). Следует отметить, что эти значения выше контрольных на 15 %.

Т а б л и ц а 2

Всхожесть и энергия прорастания после проведения криоконсервации семенного материала *Peganum garmala*

Процесс оттаивания	Энергия прорастания, %				Всхожесть, %			
	Ткань	Пластик	Фольга	Глицерин	Ткань	Пластик	Фольга	Глицерин
Оттаивание на воздухе	$10,5\pm 0,5$	$30\pm 1,2$	$35\pm 0,7$	$90\pm 1,0$	$10,5\pm 0,5$	$29,1\pm 1,0$	$34,5\pm 0,9$	$85\pm 0,9$
Быстрое размораживание	$50\pm 1,0$	$60\pm 1,4$	$47\pm 0,9$	$40\pm 0,8$	$48,1\pm 1,2$	$57,2\pm 1,3$	$41,7\pm 1,2$	$40\pm 0,7$
Посев с отсрочкой	$30\pm 0,9$	$30\pm 0,8$	$35\pm 0,7$	$80\pm 1,1$	$30\pm 0,9$	$28,3\pm 0,9$	$33,8\pm 0,9$	$75\pm 0,5$

При проведении исследований нами был использован метод программного замораживания, освоенный во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства имени Н.И.Вавилова (г. Санкт-Петербург). Семенной материал подвергался предварительному замораживанию в морозильной камере Sanyo Medical Freezer. Охлаждение семян до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ осуществлялось поэтапно. Понижение температуры происходило от $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Через каждые 15 минут температура понижалась на $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, а по достижении $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ — на $4-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем семенной материал погружался в жидкий азот и хранился в парах жидкого азота при температуре $-183-185\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 суток. Размораживание семян осуществлялось медленно, при комнатной температуре.

Исследованы показатели всхожести и энергии прорастания семенного материала в нескольких вариантах эксперимента: охлаждение до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, охлаждение до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, с последующим погружением в пары жидкого азота, охлаждение до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, с последующим погружением в жидкий азот. Наилучшие показатели энергии прорастания наблюдались у семян, подвергшихся предварительному замораживанию до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и погруженных в жидкий азот, а также охлажденных до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ без криоконсервации (табл. 3, рис. 5). Предварительное охлаждение до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ перед криоконсервацией приводит к снижению показателей энергии прорастания до 74 %, что связано, возможно, с недостаточным выходом внутриклеточной свободной воды при этой температуре. Однако следует отметить, что быстрое замораживание путем погружения в жидкий азот без криопротектора приводит к большей потере жизнеспособности семян по сравнению с контролем.

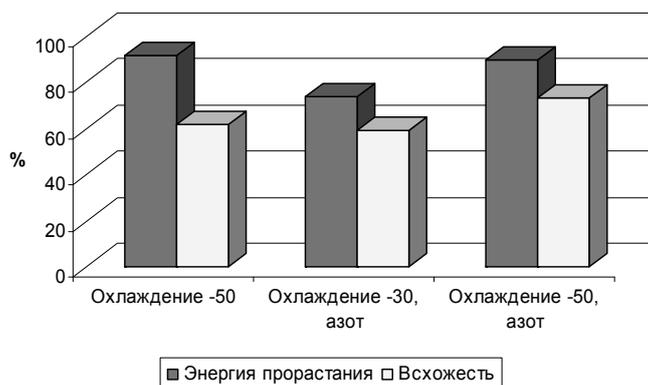


Рисунок 5. Всхожесть и энергия прорастания *Peganum garmala* после двухступенчатого замораживания

Т а б л и ц а 3

Энергия прорастания и всхожесть семян *Peganum garmala*, подвергшихся низкотемпературному охлаждению и двухступенчатому замораживанию

Показатели	Охлаждение до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$	Охлаждение до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, погружение в жидкий азот	Охлаждение до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, погружение в жидкий азот
Энергия прорастания, %	$91,3\pm 1,0$	$74\pm 0,8$	$90\pm 0,7$
Всхожесть, %	$61,5\pm 1,0$	$59,5\pm 0,9$	$73,1\pm 0,8$

Заключение

Определено, что для семян *Peganum harmala* наилучшими условиями хранения, позволяющими сохранить наиболее высокие показатели всхожести, является использование пластиковой тары, криопротектора — глицерина и быстрого размораживания на водяной бане. При этом наблюдается даже увеличение уровня энергии прорастания и всхожести на 15 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что другие способы замораживания–оттаивания позволяют сохранить жизнеспособность семян гармалы обыкновенной на уровне, сравнимом с исходным. Таким образом, предлагаемые способы низкотемпературного хранения позволят депонировать семена *Peganum harmala* неограниченное время, без вреда для зародыша семени и потери показателей всхожести и энергии прорастания, что, в свою очередь, даст возможность ввести данный вид лекарственного растения в коллекцию генетического разнообразия.

Список литературы

- 1 Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей. — М.: Мед. информ. агентство, 2000. — 976 с.
- 2 Зорина М.С., Кабанов С.П. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов // Методики интродукционных исследований в Казахстане: Сб. науч. тр. — Алма-Ата: Наука, 1976. — С. 75–85.
- 3 Мальцева М.В. Пособие по определению посевных качеств семян лекарственных растений. — М., 1950. — 56 с.
- 4 Удольская Н.Л. Методика биометрических расчетов. — Алма-Ата: Наука, 1976. — 45 с.
- 5 Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation // Australian Journal of Crop Science. — 2011. — № 5(6). — P. 778–800.
- 6 Вержук В.Г., Павлов А.В. Анализ эффективности методов криоконсервации по показателю жизнеспособности плодовых растений после криосохранения // Научный журнал НИУ ИТМО. Сер. Процессы и аппараты пищевых производств. — 2015. — № 2. — С. 162–167.
- 7 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).
- 8 Сафина Г.Ф., Бурмистров Л.А. Низкотемпературное и криогенное хранение семян груши *Pyrus L.* // Цитология. — 2004. — № 46(10). — С. 851.

Е.А.Гаврилькова, А.Ш.Додонова, В.Г.Вержук,
А.В.Павлов, М.Ю.Ишмуратова, С.У.Тлеукенова

***Peganum harmala* тұқымдық материалдарын төмен температурада сақтау**

Мақалада *Peganum harmala*ның тұқымдық материалдарын төмен температурада сақтаудың әр түрлі тәсілдері қарастырылған. Өсімдіктердің өну энергиясы мен өнгіштік деңгейі бойынша тұқымдардың тіршілік қабілеттігін сақтау деңгейі зерттелген. Тұқымдарды сұйық азотқа батыру арқылы глицерин криопротекторымен пластикалық ыдыста жылдам тоңазыту және кейінірек ауада баяу еріту бақылаумен салыстырғанда өнгіштік деңгейінің ұлғаюына әкеледі. Криопротекторларсыз тоңазытуды, сонымен қатар екісатылы бағдарламалық тоңазытуды пайдалану бастапқымен салыстыру деңгейінде тұқымдардың өнгіштігінің зерттелген көрсеткіштерін сақтауды қамтамасыз етеді. Осылайша, ұсынылған төмен температурада сақтау тәсілдері *Peganum harmala*ның тұқымдарын шексіз мерзімде еш зиянсыз тұқымдарының ұрықтары мен өну энергиясын және өнгіштік көрсеткіштерін төмендетпеу үшін сақтауға мүмкіндік береді, бұл өз кезегінде дәрілік өсімдіктің осы түрін генетикалық алуантүрліліктің топтамасына енгізуге мүмкіндік береді.

Е.А.Gavril'kova, A.Sh. Dodonova, V.G.Verzhuk,
A.V.Pavlov, M.Yu.Ishmuratova, S.U.Tleukenova

The low-temperature storage of *Peganum harmala* seed

The creation of valuable medicinal species of plants collection will save biodiversity and expand the resource base for production of medicines. This article reviews different ways of low temperature storage of *Peganum harmala* seed. The degree of conservation of seed viability, focusing on the germination level and energy was studied. Rapid freezing of seed in plastic containers with glycerin as cryo-protector, by immersion in liquid nitrogen and following slow thawing in air leads to even level of germination increase (compared with a con-

trol level of germination). Freezing without cryo-protector and also using of two-stage program freezing leads to preservation of the studied parameters of seed germination at level which is comparable with the original. So, proposed methods of low-temperature storage will let indefinitely deposit *Peganum harmala* seed without harm to the embryo of the seed and without lost of germination level or energy, what, in turn, will provide the opportunity to enter this kind of medicinal plant into the genetic diversity collection.

References

- 1 Sokolov S.Ya. *Phytotherapy and phytopharmacology: A Guide for Physicians*, Moscow: Medical Information Agency, 2000, 976 p.
- 2 Zorina M.S., Kabanov S.P. *Methods of introduction research in Kazakhstan*: Collection of scientific works, Alma-Ata, Nauka, 1976, p. 75–85.
- 3 Maltseva M.V. *Manual for the definition of sowing qualities of seeds of medicinal plants*, Moscow, 1950, 56 p.
- 4 Udolskaya N.L. *The technique of biometric calculations*, Alma-Ata: Nauka, 1976, 45 p.
- 5 Kaviani B. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, 5(6), p. 778–800.
- 6 Verzhuk V.G., Pavlov A.V. *Scientific journal NRU ITMO. Series «Processes and equipment for food production»*, 2015, 2, p. 162–167.
- 7 Nesterova S.V. *Cryoconservation of seeds of wild plants of Primorye Territory*: Dis. ... Cand. biol. sciences: 03.00.32, Vladivostok, 2004, 150 p. (RSL OD, 61: 04–3 / 1495).
- 8 Safina G.F., Burmistrov L.A. *Cytology*, 2004, 46(10), p. 851.