

А.К. Рамазанов^{1*}, С.У. Тлеукенова¹, Л.Г. Бабешина², Е.М. Сулеймен³,
Ж.Г. Ибрайбеков¹, М.А. Кинаятов⁴

¹Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова, Казахстан;

²Научный центр экспертизы медицинских средств МЗ РФ, Москва, Россия;

³Кокшетауский государственный университет им. Ш. Уалиханова, Казахстан;

⁴Карагандинский государственный технический университет, Казахстан

(*E-mail: kairidenovich_rak@mail.ru)

Влияние криоконсервации на выживаемость семян *Chamomilla reticulata* сорта «Подмосковная» и химический состав эфирного масла

В статье изучено влияние сверхкритических низких температур на количественный и качественный состав эфирного масла ромашки аптечной сорта «Подмосковная». Семена изучаемого вида растения перед посадкой в открытый грунт обрабатывали сверхнизкой температурой (–196 °С) и определяли жизнеспособность семян в лабораторных условиях. Криообработку проводили путем прямого погружения семян в пластиковые пробирках в сосуды Дюара с жидким азотом. Криопротекторы не применялись. Длительность криообработки составляла 1 ч, 3 ч и представляла ступенчатую заморозку. Обработка ступенчатой заморозки семян проводилась в следующей последовательности: 1 ч в холодильной камере (+4 °С), 1 ч в морозильной камере (–18 °С) и 1 ч в жидком азоте. Во всех случаях эксперимента применяли медленный режим оттаивания. После криогенного воздействия семенной материал высаживался в открытый грунт. Извлечение эфирного масла проводили методом гидродистилляции на аппарате Клевенджера. Определение компонентного состава эфирных масел проводили на газовом хроматографе Clugus-SQ 8 с масс-спектрометрическим детектором. В результате исследования установлено, что действие сверхнизких температур на семенной материал ромашки сорта «Подмосковная» не повлияло отрицательно на количественный и качественный состав эфирного масла ромашки аптечной. Наоборот, данный метод обработки семян положительно сказался на количественном составе эфирного масла в процессе роста растения, и в некоторых случаях повысил процентное содержание некоторых компонентов, таких как α -фарнезен, β -фарнезен, спатуленол, цис-ен-индициклоэфир.

Ключевые слова: ромашка аптечная, криоконсервация, эфирные масла, хромато-масс-спектрометрия, лабораторная всхожесть, энергия прорастания.

Введение

Ромашка аптечная (*Chamomilla recutita* (L.) Raushert., или *Matricaria chamomilla* L.) — однолетнее травянистое растение семейства Астровые (*Asteraceae*), типовой вид рода Ромашка (*Matricaria* L.). Данное лекарственное растение входит в фармакопеи более чем двадцати стран мира [1]. Цветки ромашки аптечной издавна применяются в медицинской практике в качестве противовоспалительного, антисептического и обезболивающего средства: при ангинах, тонзиллитах и других воспалительных процессах; ранозаживляющего средства — в стоматологии, гинекологии; желчегонного, противомикробного, успокаивающего, гипосенсибилизирующего, противовирусного, противотоксического средства при заболеваниях желудка, кишечника, печени, при повышенном газообразовании; действует возбуждающе на центральную нервную систему, усиливает и учащает дыхание, расширяет сосуды головного мозга. В народной медицине ромашка используется для лечения различных аллергических реакций в качестве примочек. Ромашковое масло используется в ароматерапии [2]. Это ценнейшее лекарственное растение, сырьем служат соцветия, содержащие эфирное масло, в состав которого входит более 40 компонентов. Основные лечебные свойства приписывают хамазулену, содержание его в селекционных сортах может достигать 10 % и более. В цветках ромашки лекарственной найдены флавоноиды, производные апигенина, лютеолина и кверцетина, обладающие противовоспалительным действием, а также β -каротин, кумарины, гликозиды спазмолитического действия, гликозиды потогонного действия, полисахариды и органические кислоты [3, 4].

Г.Г. Первышиной и другими были изучены качественный и количественный состав веществ ромашки аптечной и ромашки душистой, культивируемой в Российской Федерации. С помощью УФ-спектроскопии авторами было установлено, что в водных экстрактах ромашки аптечной содер-

жаты фенольные соединения, представленные фенолкарбоновыми кислотами, таннинами, флавоноидами, кумаринами, а также цис- и транс-бициклоэфирами, относящимися к полииновым соединениям, бисаболол [5].

Ранее были проведены газохроматографические исследования состава летучих органических соединений ромашки аптечной. При этом были идентифицированы альдегиды — всего 38,76 % (2-метилпропаналь, 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, пентаналь, гексаналь, бензальдегид, 3-фенилпропаналь); вторыми по содержанию — 16,26 % — были выделены сесквитерпены и их производные (β -фарнезен, аромадендрен, бисаболол оксид Б, 7-метоксикумарин, бисаболол оксид А); эфиры — 14,65 %; спирты — всего 3,7 % (гепта-4,6-диин-2-ол, 1-пентен-3-ол, 2-метилбутан-1-ол, 3-метилбутан-1-ол, 1-пентанол, 2,3-бутандиол); монотерпены и их производные — 2,97 % (α -пинен, *n*-цимен, лимонен, эвкалиптол). По дальнейшим работам автора видно, что основными составляющими веществами явились: 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, этил-2-метилбутаноат, β -фарнезен, α -бисаболол оксид Б, α -бисаболол, бисаболоксид А, хамазулен, ен-ин-дициклоэфир [6]. Основными поставщиками сырья ромашки на мировой рынок являются Аргентина, Болгария, Германия, Египет, Словакия, Чехия. На основе цветков ромашки готовят такие лекарственные препараты, как «Ромазулан», «Алором», «Арфазетин», «Ротокан», «Камилозид» [3, 7, 8].

Одним из наиболее приоритетных направлений в селекции лекарственных культур является сохранение и поддержание генофонда сортов и улучшенных популяций, созданных селекционерами на протяжении более 50 лет. В связи с тем, что не всегда есть возможность поддержания коллекции сортов лекарственных культур, осуществляется долговременное сохранение этой уникальной коллекции в виде семян. Семена являются наиболее оптимальной формой хранения генетического материала, так как образцы требуют сравнительно небольшого ухода, остаются жизнеспособными в течение длительного периода времени [9]. С этой целью в начале 70-х г. в ряде стран (Италия, Германия, США, Япония) были организованы первые центры по долговременному сохранению зародышевой плазмы. Так как продолжительность жизни семян очень разная: от нескольких часов (у некоторых тропических орхидных) до десятков и сотен лет, то одним из самых важных вопросов является режим их хранения, который зависит от видовой принадлежности, анатомических, физиологических, биохимических, морфологических особенностей семян, условий их содержания (температура, влажность, состав газовой среды и др.) [10].

Одной из основных проблем, с которой сталкиваются производители сырья лекарственных растений, остается отсутствие современных экономически эффективных технологий выращивания, а также хранения семенного материала. Около 100000 видов растений находятся под угрозой исчезновения. Стратегия сохранения биологического разнообразия на Земле сегодня включает два основных направления: сохранение *in situ* (в естественных биоценозах) и сохранение разнообразия *ex situ*: в зоопарках, заповедниках, полевых коллекциях, ботанических садах, создание генбанков животных, растений, микроорганизмов и т.д. Более 300 тысяч образцов семян хранятся в национальных, региональных и международных генбанках. В настоящее время основным способом сохранения генофонда растительных ресурсов мира *ex situ* является длительное низкотемпературное хранение семян [11].

Известно, что общепринятые режимы хранения семян при низкой положительной температуре не обеспечивают длительного хранения семян; наиболее важным, экологически чистым и сравнительно недорогим способом считается хранение семян в жидком азоте при минус 196°C (криоконсервация) [12]. В последние годы с развитием современных биотехнологических методов появляются новые технологии криосохранения семенного материала растений, что позволяет создавать генные банки длительного хранения. Осуществлять их активное размножение в необходимых объемах. На территории Казахстана криосохранение, как метод сохранения семенного материала лекарственных растений, практически не используется. Имеются отдельные работы по криоконсервации семян и апикальных меристем плодовых растений [13–15].

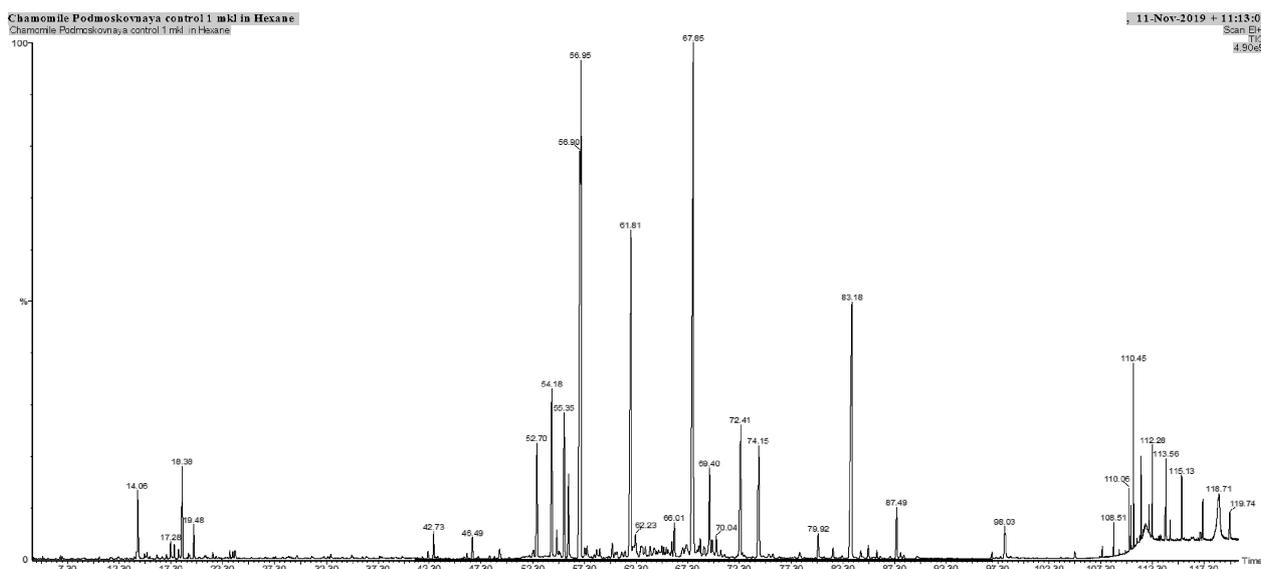
Возникает ряд вопросов при использовании метода криосохранения, например, какое оказывает действие сверхнизкая температура в последующем на рост и развитие растения, на качественный состав эфирного масла, на целебные свойства лекарственных культур и т.д.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение влияния криозамораживания на семенной материал ромашки аптечной сорта «Подмосковная» на химический состав эфирного масла.

Объекты и методика исследований

Объектом исследования являлась ромашка аптечная сорта «Подмосковная». Для изучения изменения количественного и компонентного состава эфирного масла ромашки аптечной семени данного вида растения перед посадкой в открытый грунт предварительно обрабатывали сверхнизкой температурой ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и определяли ее жизнеспособность. Всхожесть рассчитывали как отношение числа проросших семян к числу первоначально заложенных на проращивание и выражали в процентах. После оттаивания все семена ставили на проращивание в чашках Петри по 50 шт. в 4-кратной повторности на двухслойной фильтровальной бумаге, предварительно смоченной дистиллированной водой [16]. Чашки Петри с семенным материалом помещали в климатическую камеру (Binder) при температуре $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ с постоянным освещением. Кривообработку проводили путем прямого погружения семян в пластиковые пробирках в сосуды Дюара с жидким азотом [17]. Криопротекторы не применялись. Время криохранения для определения лабораторной всхожести составляло от 24 ч до 7 суток. В случае с заморозкой длительностью 24 ч образцы семян размораживали при комнатной температуре в течение 2 ч, а во втором случае (7 сут) была проведена быстрая и медленная разморозка. Быструю разморозку осуществляли в водяной бане при температуре $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин, медленную — при комнатной температуре в течение 3–4 ч. Длительность криообработки семян перед посадкой в открытый грунт составляла 1 ч, 3 ч и представляла собой ступенчатую заморозку. Обработка ступенчатой заморозки семян проводилась в следующей последовательности: 1 ч в холодильной камере ($+11\text{ }^{\circ}\text{C}$), 1 ч в морозильной камере ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) и 1 ч в жидком азоте. Во всех случаях разморозку проводили медленно. После криообработки семена были высажены в открытый грунт в поселке Ботакара в первой половине дня, в качестве органического удобрения в почву был внесен навозный перегной. Надземную часть растения собирали в фазу цветения. Сушка проводилась воздушно-тканевым способом в тени.

Извлечение эфирного масла проводили методом гидродистилляции на аппарате Клевенджера [18]. Определение компонентного состава эфирных масел осуществляли на газовом хроматографе Clarus-SQ 8 с масс-спектрометрическим детектором. Хроматографические условия: колонка капиллярная RestekRxi®-1 ms $0,25\text{ мм}\times 30\text{ м}\times 0,25\text{ мкм}$; объем пробы: 1,0 мкл; газ-носитель He; скорость газа-носителя: 1 мл/мин; деление потока 1:25; t колонки: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 мин), подъем $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, далее $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, изотермический режим при $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин; t испарителя — $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, масс-спектрометрический детектор: t — $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{EI}^+ = 70\text{ eV}$; время сканирования с 4 по 120 мин; режим сканирования ионов 39–500 m/z . Процентное содержание компонентов вычисляли автоматически, исходя из площадей пиков общей хроматограммы ионов (рис. 1). Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, с использованием библиотеки NIST. Время удерживания компонентов пересчитывали относительно предельных углеводородов.

Рисунок 1. Хроматограмма эфирного масла *Chamomilla recutita*

Результаты и обсуждение

После криообработки семян в жидком азоте длительностью 24 ч семена ромашки аптечной сорта «Подмосковная» были высажены в чашках Петри для определения лабораторной всхожести и энергии прорастания. Результаты проведенного эксперимента показаны в таблице 1.

Таблица 1

Показатели всхожести и энергии прорастания семян *Chamomilla recutita* при криообработке длительностью 24 ч

Вид растения	Группа эксперимента	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %
Ромашка аптечная, сорт «Подмосковная»	Контроль	52,5±12,5	51,5±12,6
	Криоконсервация	73,5±9,6	73,0±9,3

В результате проведенного исследования были получены следующие показатели. Контрольная группа семян ромашки аптечной сорта «Подмосковная» показала невысокую всхожесть и составила 52,5 %. Криообработка повысила всхожесть семян на 21 % (73,5 %), кроме того, на 21,5 % повысилась и энергия прорастания (рис. 2). Невысокая всхожесть семян контрольной группы, видимо, связана с длительным сроком хранения, более 1 года. Согласно литературным данным, максимальная всхожесть отмечена для семян ромашки аптечной сроком хранения от 6 до 12 месяцев, после чего наблюдается постепенное снижение всхожести [19]. Ряд авторов [4] установили важные факты, вскрывающие некоторые причины низкой всхожести семян у растений по их хранению: снижение интенсивности дыхания; увеличение содержания свободных жирных кислот; уменьшение содержания жизненно необходимых веществ; снижение содержания сахарозы; действие патогенной микрофлоры.



Рисунок 2. Влияние криообработки на всхожесть и энергию прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» (длительность заморозки 24 ч)

По сравнению с первой частью эксперимента мы провели более длительную криообработку в течение 7 суток. Также были проведены работы по изучению влияния видов оттаивания после заморозки на всхожесть семян. После глубокого замораживания провели быструю и медленную разморозки (табл. 2).

Таблица 2

Показатели всхожести и энергии прорастания семян *Chamomilla recutita* при криообработке длительностью 7 сут

Вид растения	Группа эксперимента	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %
Ромашка аптечная, сорт «Подмосковная»	Контроль	67,0±7,7	65,5±6,0
	Криоконсервация, быстрое оттаивание	71,0±15,1	65,0±13,3
	Криоконсервация, медленное оттаивание	78,0±5,6	75,5±6,0

Результаты проведенного исследования показали, что всхожесть семян ромашки аптечной сорта «Подмосковная» после криогенного хранения выше контрольных значений, как при быстром (71 %), так и при медленном оттаивании (78 %). Энергия прорастания на 10 % повысилась при медленном оттаивании, а при быстром оттаивании показатели были на уровне контроля (рис. 3).

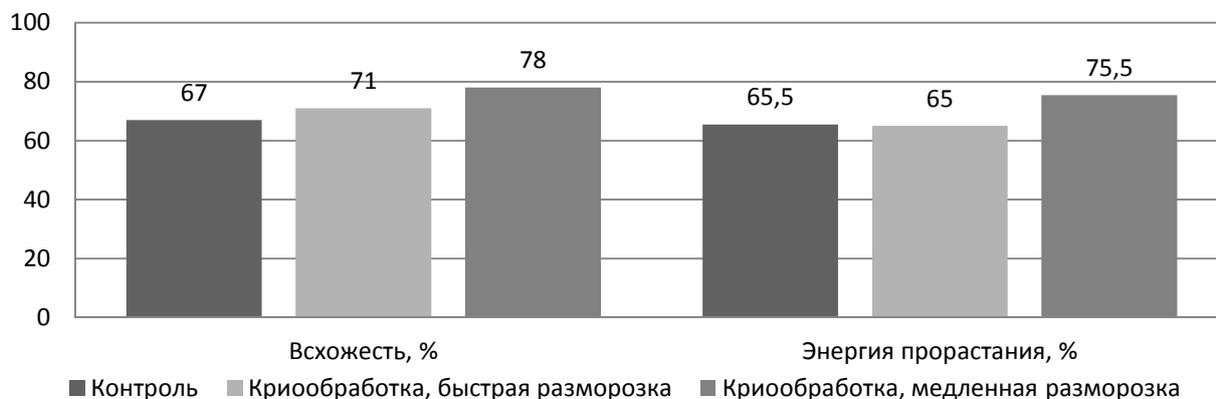


Рисунок 3. Влияние криообработки на всхожесть и энергию прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» (длительность заморозки 7 сут)

Полученные результаты показывают, что криозамораживание семян в жидком азоте (–196 °С) не оказало отрицательного действия на жизнеспособность семян ромашки аптечной, особенно при длительной заморозке (7 сут) с медленным оттаиванием. После криогенного воздействия всхожесть семян повышалась либо оставалась на уровне контроля.

Следующим этапом являлось определение количественного и качественного состава эфирного масла ромашки аптечной сорта «Подмосковная», выращенной из семян после замораживания в жидком азоте при температуре –196 °С. Экспозиция — 1, 3 ч и ступенчатая заморозка.

Эфирное масло ромашки аптечной представляет собой очень вязкую жидкость, цвета от темно-синего до голубовато-зеленого, обладающую характерным запахом: бальзамическим, медовым, отчасти цветочным, напоминающим яблочный. По этой причине масло находит применение в парфюмерии, в частности, используется для придания шипровых нот. Синяя окраска объясняется присутствием хамазулена, который сам по себе не является компонентом ромашки, но образуется из матрицина в процессе отгонки с водяным паром [20].

Извлечение эфирного масла ромашки аптечной сорта «Подмосковная» проводили методом гидродистилляции после чего был изучен и сопоставлен его количественный состав (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Количественный состав эфирных масел *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криообработки

№	Наименование образца	Масса полученного эфирного масла, мг	Выход, в перерасчете на сухое сырье, %
1	Контроль	45,6	0,046
2	Длительность криообработки 1 ч	10,9	0,052
3	Длительность криообработки 3 ч	49,9	0,185
4	Ступенчатая заморозка	56,3	0,268

Данные таблицы показывают, что количественное содержание эфирных масел в указанных выше образцах различно. Так, в образце со ступенчатой заморозкой, содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах в перерасчете на абсолютное сухое сырье составило 0,26 %, что значительно превышает значение контроля. В образце с длительностью криообработки в 3 ч количество эфирного масла составило 0,18 %, что также выше показателя контрольной группы. По-видимому, данное различие в количественном составе связано с изменениями внутриклеточных биохимических процессов в семенах под воздействием сверхнизких температур, что включило механизм, который привел к повышению количественного содержания эфирных масел при произрастании.

Методом газовой хроматографии в каждом из исследуемых образцах ромашки аптечной были определены около 45 компонентов эфирного масла. Основными компонентами являются органические соединения сесквитерпеновой группы (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Компонентный состав эфирных масел *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криообработки

Название компонентов	Контроль	Криобработка длительностью 1 ч	Криобработка длительностью 3 ч	Ступенчатая заморозка
Гермакрен D	3,5	5,9	2,2	1,8
Бициклогермакрен	3,0	5,0	1,7	2,5
Фарнезен	–	–	–	6,3
(Z)-β-Фарнезен	–	–	–	9,9
α-Фарнезен	13,8	25,2	8,1	–
Спатуленол	8,3	12,3	15,3	16,3
α-Бисабололоксид Б	15,7	–	–	1,3
α-Бисабололоксид А	2,6	0,7	–	1,7
Хамазулен	3,0	0,5	–	1,3
Цис-ен-ин-дициклоэфир	9,0	7,3	7,1	11,8

В ходе исследования было выявлено, что в контрольной группе ромашки аптечной преобладающими компонентами являются α-бисабололоксид Б — 15,7 %, α-фарнезен — 13,8, цис-ен-ин-дициклоэфир — 9,0, спатуленол — 8,3, гермакрен D — 3,5 %. Наименьшие процентные показатели у хамазулена — 3,0 % и α-бисабололоксида А — 2,6 %. Данный качественный состав эфирного масла ромашки аптечной сорта «Подмосковная» также подтверждается в работе В.В. Пунегова, где указывается, что сорт «Подмосковная» отличается высоким содержанием α-бисабололоксида Б и практическим отсутствием α-бисаболола [21].

В образце ромашки аптечной, семенной материал которой предварительно был обработан сверхнизкой температурой длительностью 1 ч, преобладающими компонентами являются α-фарнезен — 25,2 %, спатуленол — 12,3, цис-ен-ин-дициклоэфир — 7,3, гермакрен D — 5,9 и бициклогермакрен — 5,0 %. В данном образце очень низкое процентное содержание хамазулена — 0,5 %.

В образце с криообработкой длительностью 3 ч основными соединениями являются спатуленол — 15,3 %, α-фарнезен — 8,1 % и цис-ен-ин-дициклоэфир — 7,1 %. Необходимо отметить, что отличительной особенностью данного образца является полное отсутствие таких компонентов, как хамазулен, α-бисабололоксид Б и α-бисабололоксид А.

В варианте со ступенчатой заморозкой преобладают такие компоненты, как спатуленол — 16,3 %, цис-ен-ин-дициклоэфир — 11,8, β-фарнезен — 9,9, фарнезен — 6,3, бициклогермакрен — 2,5 %.

Стоит отметить, что компонентный состав эфирного масла ромашки аптечной, семена которой подвергались сверхкритической низкой температуре, отличается от контроля повышенным содержанием таких компонентов, как α-фарнезен, β-фарнезен, которые обладают противовоспалительными, успокаивающими и противогрибковыми действиями [22], спатуленол, цис-ен-ин-дициклоэфир, обладающие фунгицидными, антиаллергенными и ранозаживляющими действиями [2].

Заключение

Таким образом, по полученным нами данным, можно сделать вывод, что действие сверхнизких температур на семенной материал ромашки аптечной не повлияло отрицательно на жизнеспособность семян, на количественный и качественный состав эфирного масла. Наоборот, данный метод хранения семян положительно сказался на количественном составе эфирного масла в процессе роста растения, и в некоторых случаях даже повысил процентное содержание некоторых компонентов эфирного масла. Также повысилась энергия прорастания и всхожесть семян. В связи с этим криоконсервация, как метод хранения семян и поддержания коллекции сортов лекарственных культур, может смело применяться без риска потери ценных целебных свойств растения.

Исследования выполнены в рамках внутреннего грантового проекта Карагандинского университета им. акад. Е.А. Букетова «Сбор и подготовка образцов семян лекарственных растений, закладка опытов по криоопределению условий замораживания».

Список литературы

- 1 Загорулько Е.Ю. Подходы к стандартизации цветков ромашки аптечной (*Chamomillae recutita* flores) в Российской и зарубежных фармакопеях / Е.Ю. Загорулько, М.Г. Ожигова // Фармация и фармакология. — 2017. — Т. 5, № 2. — С. 135–149. — URL: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2017-5-2-135-149>.
- 2 Жураева А.А. Изучение компонентного состава эфирного масла цветков ромашки аптечной, произрастающей в Узбекистане / А.А. Жураева, В.Н. Абдуллабекова, К.Ш. Мухитдинова, Д.Т. Гаибназарова // Вестн. фармации. — 2018. — № 2(80). — С. 13–17.
- 3 Тоцкая С.А. Ромашка аптечная (*Chamomilla recutita* (L.) Raushert.) — объект селекции / С.А. Тоцкая, М.Ю. Грязнов // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию ВИЛАР. — М., 2016. — С. 321–324.
- 4 Губанов И.А. Лекарственные растения / И.А. Губанов. — М.: Московские университеты, 1993. — С. 8.
- 5 Первышина Г.Г. К вопросу о содержании биологически активных веществ ромашки аптечной (*Chamomilla recutita*) и ромашки душистой (*Chamomilla suaveolens*), произрастающих в Красноярском крае / Г.Г. Первышина // Химия растительного сырья. — 2002. — № 3. — С. 21–24.
- 6 Павлова Л.В. Газохроматографический анализ ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.) / Л.В. Павлова // Аналитика и контроль. — 2013. — Т. 17, № 1. — С. 66–75.
- 7 Фитопрепараты ВИЛАР: науч.-справоч. изд. — М.: Бюрос-пресс, 2009. — 256 с.
- 8 Регистр лекарственных средств России. — М.: Веданта, 2015. — 351 с.
- 9 Свистунова Н.Ю. Изучение влияния продолжительности и режима хранения сортовых семян лекарственных растений на основные посевные качества и цитогенетические характеристики их проростков / Н.Ю. Свистунова // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 85-летию Центр. бот. сада НАН Беларуси. — Минск, 2017. — С. 528.
- 10 Бутенко О.Ю. Влияние режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели / О.Ю. Бутенко, А.С. Бондаренко, Н.Н. Пелевина // Тр. СПб. науч.-исслед. ин-та лесного хозяйства. — 2014. — № 1. — С. 38–46.
- 11 Тихонова Н.Г. Стратегия и методы длительного хранения генофонда растений / Н.Г. Тихонова, Г.И. Филипенко, В.Г. Вержук, А.С. Жестков // Проблемы криобиологии. — 2008. — Т. 18, № 2. — С. 76–84.
- 12 Николаева М.Г. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Биологические свойства семян / М.Г. Николаева, В.Л. Тихонова, Т.В. Далецкая // Консервация генетических ресурсов. Информационный материал. — Пушкино: Пушкин. науч. центр РАН, 1992. — 36 с.
- 13 Ishmuratova M.Yu. Cryopreservation of *Calendula officinalis* seeds / M.Yu. Ishmuratova, S.U. Tleukenova, S.N. Atikeyeva, A.K. Auelbekova, G.O. Zhuzbayeva, Zh.Zh. Zhumagaliyeva // EurAsian Journal of BioSciences. — 2020. — Vol. 14, Iss. 1. — P. 501–505. — URL: <http://www.ejobios.org/article/cryopreservation-of-calendula-officinalis-seeds-7521>.
- 14 Павлов А.В. Криоконсервация как метод сохранения отдельных видов плодово-ягодных культур и дикорастущих лекарственных растений / А.В. Павлов, В.Г. Вержук, С.Ю. Орлова, О.Е. Радченко, М.В. Ерастенкова, А.Ш. Додонова, Е.А. Гаврилькова, М.Н. Ситников, Г.И. Филипенко, С.В. Мурашев // Probl. Cryobiol. Cryomed. — 2019. — Vol. 29, Iss. 1. — P. 44–57. — URL: <https://doi.org/10.15407/cryo29.01.044>
- 15 Kushnarenko S. Characterization and cryopreservation of *Malus sieversii* seeds / S. Kushnarenko, E. Salnikov, M. Nurtazin, Z. Mukhitdinova, I. Rakhimbaev, B.M. Reed // The Asian and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology. — 2010. — Vol. 4, special issue 1. — P. 5–9. — URL: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4609.0008>.
- 16 Зорина М.С. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов. Методики интродукционных исследований в Казахстане: сб. науч. тр. / М.С. Зорина, С.П. Кабанов. — Алма-Ата: Наука, 1987. — С. 75–85.
- 17 Кушнаренко С.В. Криоконсервация семян: метод. реком. / С.В. Кушнаренко, З.П. Мухитдинова, М.М. Аралбаева. — Алматы: Изд-во Ин-та биологии и биотехнологии растений, 2011. — 33 с.
- 18 Государственная фармакопея СССР. — Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье МЗ СССР. — 11-е изд. — М.: Медицина, 1990. — 400 с.
- 19 Тлеукунова С.У. Онтогенез ромашки аптечной сорта «Карагандинская» в условиях Центрального Казахстана / С.У. Тлеукунова, С.С. Айдосова, М.Ю. Ишмуратова // Вестн. Казах. нац. ун-та. Сер. биол. — 2008. — № 3. — С. 13–15.
- 20 Лебига Ю.А. Фармакологическое действие компонентов ромашки аптечной и ее использование в косметических средствах / Ю.А. Лебига, С.Н. Бутова, Е.А. Борисенко // Передовые пищевые технологии: состояние, тренды, точки роста: сб. науч. тр. I Междунар. науч.-практ. конф. — М., 2018. — С. 102–107.
- 21 Пунегов В.В. Изучение состава эфирного масла ромашки аптечной при интродукции в среднетаежной подзоне Республики Коми / В.В. Пунегов [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://ib.komisc.ru/add/old/t/ru/ir/vt/02-57/05.html>.
- 22 Babar A. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review / A. Babar, A.Al-W. Naser, Sh. Saiba, A. Aftab, A. KhShah, A. Firoz // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. — 2015. — Vol. 5, Iss. 8. — P. 601–611.

А.К. Рамазанов, С.У. Глеукунова, Л.Г. Бабешина, Е.М. Сүлеймен,
Ж.Г. Ибрайбеков, М.А. Кинаяттов

***Chamomilla reticulata* «Подмосковная» сорты тұқымының өміршеңдігіне криомұздатудың әсері және эфир майының химиялық құрамы**

Мақалада «Подмосковная» дәріханалық түймедағының сортындағы эфир майының сандық және сапалық құрамына шамадан тыс төмен критикалық температураның әсері зерттелген. Зерттелетін өсімдіктердің тұқымдары ашық алаңға отырғызар алдында өте төмен температурада (–196 °C) өңделіп отырғызылған және зертханалық жағдайда өміршеңдігі анықталған. Кριο өңдеу тұқымдарды пластикалық түтіктерде сұйық азоты бар Дюар ыдыстарына тікелей батыру арқылы жүзеге асырылған. Криопротекторлар қолданылмаған. Кριο өңдеудің ұзақтығы 1 сағат, 3 сағат және сатылы мұздату. Тұқымдарды сатылы мұздату келесі ретпен жүргізілген: тоңазытқышта 1 сағат (+11 °C), мұздатқыш камерасында 1 сағат (–10 °C) және сұйық азотта 1 сағат. Барлық жағдайларда жібіту баяу жүргізілді. Кριο өңдеуден кейін тұқымдар топыраққа отырғызылған. Эфир майын шығарып алу Клевенджер аппаратында гидродистилляция арқылы жүзеге асырылды. Эфир майларының құрамы Clarus-SQ 8 газды хроматографтың масс-спектрометриялық детектор көмегімен анықталды. Зерттеу нәтижесінде тұқымға өте төмен температураның әсері түймедақтағы эфир майының сандық және сапалық құрамына теріс әсер етпейтіні анықталды. Керісінше, тұқым өңдеудің бұл әдісі өсімдіктің өсу кезеңінде эфир майының сандық құрамына оң әсерін тигізді, ал кейбір жағдайларда тіпті кейбір компоненттердің, мысалы, α -фарнезен, β -фарнесен, спатуленол, цис-ен-дициклоэфир сияқты пайыздық үлесін арттырды.

Кілт сөздер: түймедақ, кριο өңдеу, эфир майлары, хромато-масс-спектрометрия, зертханалық өну, өсу энергиясы.

A.K. Ramasanov, S.U. Tleukenova, L.G. Babeshina, Ye.M. Suleimen,
Zh.G. Ibraibekov, M.A. Kinayatov

Influence cryo preservation on viability of *Chamomilla reticulata*' seeds varia «Podmoskovnaya» and chemical composition of essential oil

The article examines the effect above critical low temperatures on the quantitative and qualitative composition of essential oil of *Chamomilla reticulata* varia «Podmoskovnaya». Seeds of the studied plant species were treated with ultra-low temperature (–196 °C) before planting in open ground and the viability of the seeds was determined under laboratory conditions. Cryo processing was carried out by direct immersion of seeds in plastic tubes in Dewar vessels with liquid nitrogen. Cryoprotectants were not used. Cryo processing duration was 1 hour, 3 hour and step freezing. Step freezing of seeds was performed in the following sequence: 1 hour in the refrigerating compartment (+ 4 °C), 1 hour in the freezing compartment (–8 °C) and 1 hour in liquid nitrogen. In all cases of the experiment, a slow thawing regime was applied. After cryogenic exposure, the material was planted into open ground. Recovery of essential oil was carried out by hydro distillation on a Clevenger apparatus. The component composition of the essential oils was determined on a Clarus-SQ 8 gas chromatograph with a mass spectrometric detector. As a result of the study, it was found that the effect of ultra-low temperatures on the seed material of the Moscow Region chamomile did not negatively affect the quantitative and qualitative composition of the essential oil of the pharmacy chamomile. On the contrary, this method of treating seeds has had a positive effect on the quantitative composition of the essential oil during the growth of the plant and in some cases has even increased the percentage of certain components, such as α -farnesene, β -farnesene, spatulenol, cis-en-in-dicycloether.

Keywords: Chamomilla reticula, cryopreservation, essential oil, chromate-mass-spectrometry, laboratorial germination, energy of germination.

References

- 1 Zagorulko, E.Yu., & Ozhigova, M.G. (2017). Podhody k standartizatsii tsvetkov romashki aptechnoi (*Chamomillae recutita* flores) v Rossiiskoi i zarubezhnoi farmakopeiakh [Approaches to the standardization of chamomile flowers (*Chamomillae recutita* flores) in Russian and foreign Pharmacopoeia]. *Farmatsiia i farmakologhiia — Pharmacy and Pharmacology*, 5, 2, 135–149. URL: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2017-5-2-135-149> [in Russian].
- 2 Zhuraeva, A.A., Abdullabekova, V.N., Mukhitdinova, K.Sh., & Gaibnazarova, D.T. (2018). Izuchenie komponentnoho sostava efirnoho masla tsvetkov romashki aptechnoi, proizrastaiushchei v Uzbekistane [The study of the component composition of the essential oil of chamomile flowers pharmacy growing in Uzbekistan]. *Vestnik farmatsii — Bulletin of pharmacy*, 2(80), 13–17 [in Russian].

- 3 Totskaia, S.A., & Griaznov, M.Iu. (2016). Romashka aptechnaia (*Chamomilla recutita* (L.) Raushert.) — obekt selektsii [Chamomile chemist's (*Chamomilla recutita* (L.) Raushert.) — object of selection]. Proceedings from Biological characteristics of medicinal and aromatic herbs and their role in medicine: *Mezhdunarodnaia nauchno-prakticheskaiia konferentsiia, posviashchennaia 85-letiiu VILAR — International scientific-practical conference dedicated to the 85th anniversary of All-Russian Institute of Medical and Aromatic Plants*. (p. 321–324). Moscow [in Russian].
- 4 Gubanov, I.A. (1993). *Lekarstvennye rasteniia [Medicinal herbs]*. Moscow: Moskovskie universitety [in Russian].
- 5 Pervyshina, G.G. (2013). K voprosu o sodержanii biologicheskii aktivnykh veshchestv romashki aptechnoi (*Chamomilla recutita*) i romashki dushistoi (*Chamomilla suaveolens*), proizrastaiushchikh v Krasnoarskom krae [On the content of biologically active substances of chamomile pharmacy (*Chamomilla recutita*) and fragrant chamomile (*Chamomilla suaveolens*), growing in the Krasnoyarsk Territory]. *Khimiia rastitel'nogo syriia — Chemistry of Plant Materials*, 3, 21–24 [in Russian].
- 6 Pavlova, L.V. (2013). Hazokhromatograficheskii analiz romashki aptechnoi (*Chamomilla recutita* R.) [Gas chromatographic analysis of chamomile pharmacy (*Chamomilla recutita* R.)]. *Analitika i kontrol — Analytics and control*, 17, 1, 66–75 [in Russian].
- 7 *Fitopreparaty VILAR [Phytopreparations of All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants]*. (2009). Moscow: Borus-press [in Russian].
- 8 *Rehistr lekarstvennykh sredstv Rossii [Register of medical facilities of Russia]*. (2015). Moscow: Vedanta [in Russian].
- 9 Svistunova, N.Yu. (2017). Izuchenie vliianiia prodolzhitel'nosti i rezhima khraneniia sortovykh semian lekarstvennykh rastenii na osnovnye posevnye kachestva i tsitoheneticheskie kharakteristiki ikh prorostkov [Studying the influence of the duration and storage mode of varietal seeds of medicinal herbs on the main sowing qualities and cytogenetic characteristics of their seedlings]. Proceedings from The Role of Botanical Gardens and Arboretums in the conservation, study and sustainable use of plant diversity: *Mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia, posviashchennaia 85-letiiu Tsentral'nogo botanicheskogo sada NAN Belarusi — International Scientific Conference dedicated to the 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the NAS of Belarus* (p. 528). Minsk [in Russian].
- 10 Butenko, O. Yu., Bondarenko, A.S., & Pelevina, N.N. (2014). Vliianie rezhimov zamorazhivaniia i ottaivaniia na vskhozhest semian sosny i eli [Influence of freezing and thawing regimes on germination of pine and spruce seeds]. *Trudy Sankt-Peterburhskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khoziaistva — Proceedings of the St. Petersburg research Institute of forestry*, 1, 38–46 [in Russian].
- 11 Tikhonova, N.G., Filipenko, G.I., Verzhuk, V.G., & Zhestkov, A.S. (2008). Stratehiia i metody dlitel'nogo khraneniia henofonda rastenii [Strategy and methods of long-term storage of the herbs gene pool]. *Problemy kriobiologii — Problems of Cryobiology*, 18, 2, 76–84 [in Russian].
- 12 Nikolaeva, M.G., Tikhonova, V.L., & Daletskaiia, T.V. (1992). Dolhovremennoe khranenie semian dikorastushchikh vidov rastenii. Biologicheskii svoistva semian [Long-term storage of seeds of wild herbs species. Biological properties of seeds]. *Konservatsiia heticheskikh resursov. Informatsionnyi material — Conservation of genetic resources. Information material*. Pushchino: Pushchinskii nauchnyi tsentr, 36 [in Russian].
- 13 Ishmuratova, M.Yu., Tleukenova, S.U., Atikeyeva, S.N., Auelbekova, A.K., Zhuzbayeva, G.O. & Zhumagaliyeva, Zh.Zh. (2020). Cryopreservation of *Calendula officinalis* seeds. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14(1), 501–505. — URL: <http://www.ejobios.org/article/cryopreservation-of-calendula-officinalis-seeds-7521>.
- 14 Pavlov, A.V., Verzhuk, V.G., Orlova, S.Yu., Radchenko, O.E., Erastenkova, M.V., & Dodonova, A.Sh. et al. (2019). Kriokonservatsiia kak metod sokhraneniia otdelnykh vidov plodovo-yahodnykh kultur i dikorastushchikh lekarstvennykh rastenii [Cryo preservation as a method for storage of separated species of fruit-berry cultures and wild medical plants]. *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny*, 29(1), 44–57. URL: <https://doi.org/10.15407/cryo29.01.044> [in Russian].
- 15 Kushnarenko, S., Salnikov, E., Nurtazin, M., Mukhitdinova, Z., Rakhimbaev, I. & Reed, B.M. (2010). Characterization and cryopreservation of *Malus sieversii* seeds. *The Asian and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 5–9. URL: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4609.0008>.
- 16 Zorina, M.S., & Kabanov, S.P. (1987). *Opreделение semennoi produktivnosti i kachestva semian introdutsentov. Metodiki introduktsionnykh issledovaniy v Kazakhstane [Determination of seed productivity and quality of seed of introduced plants]*. Alma-Ata: Nauka, 75–85 [in Russian].
- 17 Kushnarenko, S.V., Mukhitdinova, Z.R., & Aralbayeva, M.M. (2011). *Kriokonservatsiia semian [Cryo preservation of seeds]*. Almaty: Publ. of Institute of biology and biotechnology [in Russian].
- 18 *Hosudarstvennaia farmakopeia SSSR. Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syre MZ SSSR [The State Pharmacopeia of USSR. Vol. 2. General methods of analysis. Vegetative raw materials. MH of USSR]*. (1990). Moscow: Meditsina [in Russian].
- 19 Tleukenova, S.U., Aidosova, S.S., & Ishmuratova, M.Yu. (2008). Ontohenez romashki aptechnoi sorta «Karahandinskaia» v usloviiakh Tsentral'nogo Kazakhstana [Ontogenesis of *Chamomilla reticulata* sort «Karagandinskaya» in the conditions of the Central Kazakhstan]. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo universiteta. Serii biologiiia — Bulletin of Kazakh National University. Biology series*, 3, 13–15 [in Russian].
- 20 Lebiga, Yu.A., Butova, S.N., & Borisenko, E.A. (2018). Farmakologicheskoe deistvie komponentov romashki aptechnoi i ee ispolzovanie v kosmeticheskikh sredstvakh [Pharmacological action of the components of chamomile, pharmacy and its use in cosmetics]. Proceedings from Advanced food technology: state, trends, growth points: *I Mezhdunarodnaia nauchno-prakticheskaiia konferentsiia — I International Scientific and Practical Conference*. (p. 102–107). Moscow [in Russian].
- 21 Punegov, V.V. Izuchenie sostava efir'nogo masla romashki aptechnoi pri introduktsii v srednetaezhnoi podzone Respubliki Komi [The study of the composition of the essential oil of chamomile pharmacy during the introduction in the middle taiga subzone of the Komi Republic]. *ib.komisc.ru*. Retrieved from <https://ib.komisc.ru/add/old/t/ru/ir/vt/02-57/05.html> [in Russian].
- 22 Babar, A., Naser, A. Al-W, Saiba, Sh., Aftab, A., Shah, A.Kh., & Firoz, A. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601–611.