

НАО «Карагандинский национальный исследовательский университет  
имени академика Е.А. Букетова»

УДК 633.81

На правах рукописи

**РАМАЗАНОВ АЛИБЕК КАЙРИДЕНОВИЧ**

**Криогенное хранение и разработка методов краткосрочного и  
долгосрочного хранения семян сортов *Chamomilla recutita***

6D060700 – Биология

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Зарубежный научный консультант  
доктор биологических наук,  
профессор  
М.М. Силантьева

Научный консультант  
кандидат биологических наук,  
ассоциированный профессор  
С.У. Тлеуменова

Республика Казахстан  
Караганда, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b> .....	4
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>1 ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ (CHAMOMILLA RECUTITA (L.) RAUSCHERT)</b> .....	11
1.1 Биологическое описание и систематическое положение .....	11
1.2 Применение и химический состав .....	12
1.3 Антиоксидантная активность .....	25
1.4 Антибактериальная активность .....	28
1.5 Противовоспалительная активность .....	39
1.6 Противоопухолевое действие .....	39
1.7 Противогрибковая активность .....	40
1.8 Противопаразитарное и инсектицидное действие .....	41
1.9 Интродукция .....	41
1.10 Сорта ромашки аптечной .....	42
1.11 Криоконсервация растительного материала.....	43
1.12 Использование криопротекторов при кроконсервации.....	45
1.13 Токсичность криопротекторов.....	48
<b>2 КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЯН</b> .....	49
<b>3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	53
3.1 Объект исследования .....	53
3.2 Методы исследования .....	53
3.3 Метод криоконсервации семенного материала .....	54
3.4 Предпосевная обработка семян .....	56
3.5 Определение количественного накопления и компонентного состава эфирного масла .....	57
3.6 Изучение анатомического строения семян и проростков.....	58
3.7 Изучение ультраструктуры поверхности семян .....	58
3.8 Статистическая обработка данных.....	58
<b>4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	59
4.1 Морфологический анализ семенного материала сортов <i>Chamomilla recutita</i> .....	59
4.2 Определение влажности и жизнеспособности свежесобранных семян сортов <i>Chamomilla recutita</i> .....	60
4.3 Всхожесть семян сортов <i>Chamomilla recutita</i> в зависимости от сроков хранения.....	62
4.4 Изучение влияния криозамораживания на структуру семенной кожуры сортов <i>Chamomilla recutita</i> .....	64
4.5 Анатомическое строение проростков сортов <i>Chamomilla recutita</i> ....	66
4.6 Влияние тары на жизнеспособность семян сортов <i>Chamomilla recutita</i> после криоконсервации.....	75
4.7 Оптимизация условий размораживания семян сортов <i>Chamomilla</i>	

<i>recutita</i> после криоконсервации.....	77
4.8 Влияние краткосрочного и долгосрочного криохранения на всхожесть семян сортов <i>Chamomilla recutita</i> .....	87
4.9 Изучение влияния криопротекторов на жизнеспособности семян сортов семян <i>Chamomilla recutita</i> при хранении в жидком азоте.....	91
4.10 Комплексная оценка влияния криоконсервации с использованием криопротектора PVS2 на жизнеспособность семян, морфометрию и водный баланс проростков <i>Chamomilla re</i> .....	101
4.11 Изучение влияния физических факторов на всхожесть и энергию прорастания семян сортов <i>Chamomilla recutita</i> после криохранения.....	108
<b>5 СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО НАКОПЛЕНИЯ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ СОРТОВ <i>CHAMOMILLA RECUTITA</i> ПОСЛЕ КРИООБРАБОТКИ СЕМЯН.....</b>	<b>113</b>
<b>6 РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЯН СОРТОВ <i>CHAMOMILLA RECUTITA</i>.....</b>	<b>117</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>118</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>120</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А – Криоконсервация семенного материала лекарственных растений: монография.....</b>	<b>137</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Методические рекомендации.....</b>	<b>138</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В – Справка и сертификат о повышении квалификации по криоконсервации семян лекарственных растений.....</b>	<b>139</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Акты внедрения итогов диссертационной работы..</b>	<b>141</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Внешний вид проростков сортов <i>Chamomilla recutita</i> при оптимизации условий размораживания после криоконсервации.....</b>	<b>144</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Определение количественного и качественного состава эфирных масел из надземной части сортов <i>Chamomilla recutita</i>, выращенных из предварительно криоконсервированных семян.....</b>	<b>146</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж – Состав эфирного масла сортов <i>Ch. Recutita</i>.....</b>	<b>149</b>

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**Криоконсервация семян** – это процесс длительного хранения семян растений при очень низких температурах, обычно в диапазоне от  $-130^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$  (температура жидкого азота).

**Криопротектор** – это вещество, которое используется для защиты биологических материалов (клеток, тканей, органов, семян и др.) от повреждений, возникающих при замораживании и последующем размораживании.

**Генетические банки** – специализированные хранилища, где семена, клетки, ткани или другие генетические материалы сохраняются при контролируемых условиях для долгосрочного хранения и будущего использования.

**Ортодоксальные семена** – это семена, которые могут быть высушены до очень низкого уровня влажности (обычно до 5% или ниже) и заморожены до экстремально низких температур без потери жизнеспособности.

**Рекальцитрантные семена** – это семена, которые не могут быть высушены до низкого уровня влажности и при замораживании до экстремально низких температур теряют жизнеспособность.

**Всхожесть семян** – это показатель успешного прорастания семян за определенный промежуток времени, который выражается в процентах от общей массы протестированных семян.

**Энергия прорастания** – это скорость, с которой семена прорастают в начальный период после посева, которая выражается в процентах и указывает на дружное прорастание.

**Биология прорастания** – это раздел ботаники, изучающий процессы, происходящие в семенах от момента их набухания до появления первого корешка и проростка.

**Давленный препарат** – это вид микроскопического препарата, при котором биологический материал помещается на предметное стекло и затем накрывается покровным стеклом с легким давлением.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ЖА	– жидкий азот
МР	– медленное размораживание
БР	– быстрое размораживание
ГК	– гибберелловая кислота
ПГ	– пропиленгликоль
ДМСО	– диметилсульфоксид
PVS2	– «Plant Vitrification Solution 2» – раствор для витрификации растений
ЛВ	– лабораторная всхожесть
ЭП	– энергия прорастания
МС	– питательная среда Мурасиге и Скуга
СхВ	– Сухой вес
СвВ	– Свежий вес
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
POWO	– Plants of the World Online, интернет ресурс по поиску таксономических названий растений
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Наиболее ценным и незаменимым природным ресурсом являются растения, особенно лекарственные, которые имеют широкое применение, как в официальной медицине, так и в народной [1]. В современной медицине в настоящее время уделяется особое внимание лекарственным средствам, изготавливаемым из различных видов лекарственных растений. Высокий интерес к лекарственным растениям объясняется их высокой фармакологической активностью. Препараты на основе лекарственных трав легко усваиваются, не кумулируются и легко выводятся из организма, практически не имеют токсического воздействия, по сравнению с препаратами синтетического характера.

Развитие производства лекарственного сырья актуально в Казахстане в свете обеспечения местным сырьем фармацевтической отрасли [2].

Во флоре республики растет около 6000 видов сосудистых растений, четверть которых проявляет лекарственные свойства. В ГФ РК внесено 132 таксона, однако, порядка 30% не встречаются в местной флоре. Следует отметить, что в Казахстане по нескольким видам лекарственных растений имеются небольшие запасы, но для полного обеспечения сырьем их недостаточно [3-5].

В лекарственном растениеводстве одним из важных направлений является семеноводство и создание устойчивых запасов семян растений. Всем известно, что семена большинства лекарственных растений быстро теряют свою всхожесть в течение 2-5 лет и хранятся ограниченное время [6-11]. Традиционные способы сохранения семян при температуре от 0-+5 до -15°C не полностью способны сохранить полноценную жизнеспособность в течение длительного периода. Так как в процессе хранения происходят физические и физиологические изменения (потеря влаги, поражение грибами, бактериями, вредителями, накопление продуктов распада и т.д.). Поэтому применение хранения при температуре сжиженного азота (-196°C) оказывается более перспективным направлением для семеноводства лекарственных растений и сохранения их генетических ресурсов [12, 13].

Криогенное хранение (криоконсервация) позволяет хранить семенной материал растений длительный период, причем, не только с сохранением жизненных процессов, но и с повышением жизнеспособности [14]. В перспективе семена могут храниться неограниченное по срокам время.

В Казахстане метод сохранения семян лекарственных культур в жидком азоте мало апробирован, в основном исследования направлены на замораживание меристем, пыльцевых зерен, почек, черенков и др.

Как было отмечено ранее, что процесс криоконсервации семян изучается продолжительное время, но применение данного метода протестировано на небольшом числе лекарственных культур, поэтому перед нами была поставлена задача определить условия криоконсервации семенного материала сортов

*Chamomilla recutita* и разработать алгоритм долгосрочного и краткосрочного хранения.

Таким образом, выполнение научных исследований по разработке основ краткосрочного и долгосрочного хранения семян *Chamomilla recutita* при помощи методов криоконсервации является на данный момент важным и актуальным направлением.

**Цель диссертационной работы** изучение влияния сверхнизких температур на семенной материал сортов *Chamomilla recutita* и разработка методов долгосрочного и краткосрочного хранения.

**Задачи исследования:**

1. Определение жизнеспособности семян в зависимости от сроков хранения и изучение морфометрических и анатомических показателей семенного материала сортов ромашки аптечной до и после замораживания в жидком азоте.

2. Оптимизация условий замораживания и размораживания семенного материала сортов ромашки аптечной после криоконсервации.

3. Изучение влияния физических факторов на жизнеспособность семенного материала сортов ромашки аптечной и подбор оптимальных концентраций протекторов при криохранении.

4. Определение количественного накопления эфирных масел ромашки аптечной сортов «Карагандинская» и «Подмосковная» после криогенного хранения.

5. Разработка алгоритмов криозамораживания семян сортов ромашки аптечной.

**Объекты исследования:** семенной материал ромашки аптечной сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Семена были собраны в питомнике Международного научно-производственного центра «Фитохимия», а также получены по делектусу из Алтайского ботанического сада.

**Методы исследования:** оценка семенной всхожести и биологии прорастания, криоконсервирование семян путем прямого погружения в сосуды Дюара с жидким азотом, использование двух методов размораживания (быстрое и медленное размораживание), анатомическое изучение строения семян и проростков методом давленых препаратов, использование сканирующего электронного микроскопа (СЭМ микроскопия), определение количественного накопления эфирного масла методом водной дистилляции. С помощью программного обеспечения Microsoft Excel и среды RStudio проводилась статистическая обработка и графическая визуализация полученных данных.

**Научная новизна исследования:**

1. Впервые исследованы жизнеспособность семян 4-х сортов ромашки аптечной в зависимости от условий криоконсервации, исследованы анатомо-морфометрические показатели проростков;

2. Впервые выявлено действие криопротекторов на всхожесть и энергию прорастания семян сортов ромашки аптечной, что позволило подобрать оптимальные виды и концентрации криопротекторов.

3. Впервые изучено влияние предпосевных методов обработки семенного материала сортов ромашки аптечной с использованием физических факторов.

4. Впервые выявлено количественное накопление эфирного масла в надземных органах двух сортов ромашки аптечной, его компонентный состав после хранения семян в жидком азоте.

**Теоретическая и практическая значимость результатов.** Исследование условий криоконсервации семян сортов ромашки аптечной показало, что оптимальной тарой при криозамораживании являются пластиковые криопробирки.

Определено, что при криоконсервации семян ромашки аптечной следует использовать метод медленного размораживания.

В качестве криопротекторов рекомендовано использовать раствор PVS2, высококонцентрированную сахарозу, глюкозу, фруктозу и ДМСО, также низкоконцентрированный пропиленгликоль.

Определено, что после воздействия сверхнизких температур анатомо-морфологическое строение семян и проростков всех 4-х сортов ромашки аптечной не изменяется.

Доказано, что при длительном криогенном хранении семян ромашки аптечной всхожесть 3-х сортов повышается.

Выявлено, что после криогенного хранения предпосевная обработка семян физическими факторами активации повышает всхожесть и энергию прорастания исследуемых сортов.

Установлено повышается содержания эфирного масла и отдельных компонентов в траве ромашки аптечной сортов «Карагандинская» и «Подмосковная» после криоконсервации семян

Разработанный алгоритм криоконсервации и методические рекомендации позволили внедрить семена ромашки аптечной 4-х сортов в криогенный банк лекарственных растений исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга БГФ КарУ им. Е.А. Букетова».

Результаты научных исследований внедрены в практическую деятельность и учебный процесс.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Хранение семенного материала ромашки аптечной традиционным методом в течении 3-х лет снижает лабораторную всхожесть.

2. Оптимизация условий замораживания семян ромашки аптечной показала, что такие сорта, как Айболит, Карагандинская и Старый лекарь положительно отреагировали на длительное хранение в жидком азоте. Для семян сорта Подмосковная лучше использовать краткосрочное криоконсервирование. При оптимизации условий размораживания семян было выявлено, что для сортов «Подмосковная», «Айболит» и «Карагандинская»

наиболее подходящим методом оттаивания является медленная разморозка, а для сорта «Старый лекарь» быстрая.

3. При сверхнизком замораживании семян ромашки аптечной для предотвращения образования внутри клеток повреждающих кристаллов льда необходимо использовать высококонцентрированные криопротекторы такие, как сахароза, глюкоза, фруктоза, ДМСО и низкоконцентрированный пропиленгликоль, а также криопротекторный раствор PVS2.

4. Сверхнизкая температура повышает количественное накопление эфирных масел в надземной части ромашки аптечной.

**Связь данной работы с научно-исследовательскими проектами.** Диссертационная работа выполнена в рамках реализации грантового проекта Комитета науки МОН РК №АР09259548 «Криоконсервация семенного материала дикорастущих и лекарственных растений и организация банка краткосрочного и долгосрочного хранения» (2021-2023).

#### **Апробация работы.**

Итоги диссертационного исследования были обсуждены и доложены на:

– международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Караганда, 2018 – 16-17 ноября);

– всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию Н.В. Цицина «Наследие академика Н.В. Цицина. Современное состояние и перспективы развития» (Москва, 2019 – 8-11 июля);

– 6-й всероссийской конференции с международным участием «ЭкоБиоТех 2019» (Уфа, 2019 – 1-4 октября);

– 5-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Методология, теория и практика современной биологии» (Костанай, 2020 – 13 марта);

– международной научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Полтава, 2020 – 29-30 июня);

– международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2021, 16-17 декабря)

– 15-й международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии» (Караганда, 2023 – 20-21 января);

– Республиканской научно-практической конференции (с международным участием), приуроченной к 80-летию юбилею ученого-педагога, профессора кафедры ботаники Ахметжановой Айтбалы Ибжановны «Актуальные проблемы биологии и экологии».

Результаты диссертационного исследования опубликованы в научном журнале, входящем в наукометрическую базу Scopus “Research on Crops”, в журналах, рекомендованных КОКСНВО РК – «Bulletin of the Karaganda University, series biology». Выпущена в печать монография по криоконсервации семенного материала лекарственных растений (Приложение А) и разработаны практические рекомендации (Приложение Б). С 28 июня по 2 июля прошел

теоретический и практический курс в лаборатории РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН Республики Казахстан (Приложение В).

**Внедрение результатов работы.**

Результаты исследований внедрены в учебный процесс биолого-географического факультета НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова» по дисциплинам ботаника и криобиология, в деятельность исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга для выполнения работ по криобиологии, а также внедрены в научный процесс для организации работы семенного банка растений Алтайского ботанического сада (Приложение Г).

**Декларация личного участия автора.** Автором лично разработана программа диссертационного исследования, проведена экспериментальная часть работы, выполнены исследования по криоконсервации семенного материала. Автор лично занимался сбором исходных данных, проведением статистической обработки и анализов полученных результатов. Были сформулированы основные положения, выводы, написаны основные разделы диссертационного исследования. Самостоятельно подготовлены и опубликованы научные статьи. Личный вклад автора составил 90%.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация включает введение, 6 основных раздела, заключение, список использованных источников и приложения. Объем диссертации составляет 155 страниц, работа проиллюстрирована 58 рисунками, 9 таблицами. Список использованных источников включает 239.

# 1 ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ (*CHAMOMILLA RECUTITA* (L.) RAUSCHERT)

## 1.1 Биологическое описание и систематическое положение

Систематическое положение *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert дано согласно сводки Черепанова С.К. и сайта Plantarium [15, 16].

Отдел: *Magnoliophyta* - цветковые, или покрытосемянные растения.

Класс: *Dicotyledones* – двудольные.

Подкласс: *Asteridae* – астериды.

Порядок: *Asterales* – астроцветные.

Семейство: *Asteraceae (Compositae)* – сложноцветные.

Род: *Matricaria* L. – ромашка.

Вид: *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert – ромашка аптечная, дәрілік түймедағы.

*Matricaria* – род (семейство *Asteraceae*), был утвержден Линнеем. Предполагается, что данное родовое название Линней возможно выбрал из-за его широкого применения при лечении различных гинекологических заболеваний (заболеваний матки - matrix) [17], что также отражается и в русских народных названиях – ворожка, маточница, маточная трава, маточник, девичник, романовая трава, романец, румянка, белюшка, солнечник и др. [18]. Род характеризуется 5 видами, в основном распространенных в Западной, Юго-Западной и Центральной Азии, Северной Африке, Европе, а также на западе Северной Америки [19]. *Matricaria* обычно произрастает на необработанных почвах, пастбищах, вдоль автомобильных и железных дорог, на пустырях, что говорит о её хорошей адаптируемости к различным условиям [20, 21]. В настоящее время род распространен по всему миру [22].

*Ch. recutita* представляет собой однолетнее травянистое растение, высотой от 15 до 80 см, трава обладает сильным ароматом [23]. Корень тонкий, стержневого типа, светло-бурый. Стебель одиночный, в верхней части ветвистый, прямой, иногда внутри развивается полость. Листья сидячие, 3-5 см длиной, дважды-, трижды перисто-рассеченные, конечные дольки острые, узкие, линейные, до 5 мм шириной [23, р. 479-1-479-40]. Цветочные корзинки развиваются на верхушках побегов, 0,5-0,8 см в диаметре, с выпуклым цветоложем, которое принимает коническую форму к концу фазы цветения. Пестичные цветки язычкового типа, с белым отгибом, венчик с тремя зубчиками, сидят по периметру соцветия; трубчатые цветки обоеполые, желто-окрашенные. Венчик с пятью зубцами, расположены в центре соцветия. Тычинок обычно пять, которые срастаются пыльниками в трубку вокруг пестика. Пестик с одногнездной нижней завязью, столбик тонкий, рыльце – двулопастное. Плод семянка, форме - продолговатая, цвет – буроватый или зеленый, хохолок отсутствует, носик - 0,8-1,2 мм, форма – изогнутая с косо усеченной верхушкой, поверхность покрыта мелкими продольными ребрышками [24, 25]. Иногда поверхность семени имеет серый цвет [26]. Семенной материал мелкий, вес 1000 штук 0,02-0,05 г [27, 28]. Семена в норме

прорастают без периода покоя, необходимая температура от +6°C, оптимальная - +20-30°C. Растение цветет длительно (мая-октябрь), в зависимости от погодных условий и количества сборов сырья [29].

Как сообщают Диоскорид и Плиний ромашка аптечная свое видовое название получила от греческих слов *chamai*- «земляной» и *melon*- «яблоко», что означает «земляное яблоко». Её цветкам присущ запах, напоминающий яблочный. Плинием Старшим ромашка описана под названием *Chamai melon* [30]. В XVIII веке впервые появилось русское название «ромашка».

В разное время *Ch. recutita* относили к разным родам, в связи с этим в литературных источниках можно встретить несколько латинских названий этого растения – *Matricaria chamomilla*, *Matricaria recutita*, *Chamomilla recutita*. В настоящее время в современной систематике и номенклатуре растений научным названием ромашки аптечной является *Ch. recutita* (L.) Rauschert [15, с. 3-890].

*Ch. recutita* произрастает в Австрии, Беларуси, Болгарии, Бурятии, на Канарских островах, в Европе, северной Африке (Египет), Восточной, Западной и Юго-Восточной Азии [31].

Широко культивируется во многих странах мира [32, 33]. Лидерами по производству товарного лекарственного сырья выступают Венгрия, Франция, Германия, Египет, Новая Зеландия [22, р. 82-94]. Есть упоминания о культуре ромашки в восточной и западной [34] Африке (рисунок 1).



Рисунок 1 – Карта произрастания и культивирования *Chamomilla recutita*

Примечание – Составлено по источнику [31]

## 1.2 Применение и химический состав

*Ch. recutita* является лекарственным растением, которая широко применяется в традиционной медицине (таблица 1).

Таблица 1 – Применение *Ch. rescutita* при различных заболеваниях

Страна	Местное название средства	Используемая часть растения	Способ приготовления	Использование
1	2	3	4	5
Марокко	Babonj	Соцветия, целое растение, листья	Настои, отвары	При сахарном диабете, при нервных расстройствах, как спазмолитик, при коликах, диарее, при нервозности, депрессии, стенокардии, стоматите, при болезненной менструации, лихорадке, абсцессе, инфекции
Турция	Babunec Paratya	Соцветия	Настои	При простуде, коликах и спазмах, как успокоительное
Испания	Не указан	Целое растение	Настои	При расстройствах пищеварения, гастралгии, при конъюнктивите, дисменорее, простуде, кашле, инфекциях женских половых органов
Каталония, Испания	Samamilla, Camamilla de jardí	Не указан	Настои, отвары	В качестве антисептика при глазных заболеваниях, конъюнктивите, при заболеваниях ЖКТ
Португалия	Samomila	Соцветия, целое растение	Настои, отвары	При депрессиях, нервозности, стрессе, бессоннице, невралгии, ишиалгии, при расстройствах пищеварения, инфекциях полости рта, горла и уха, при астме
Италия	Samumilla, Hammamilla, Kamilica	Целое растение, корень, соцветия	Настои, отвары, ванночки	При простуде, кашле, растяжениях связок, переломах костей, при раздражительности, заболеваниях глаз, конъюнктивите, при абдоминальных коликах, болях в ЖКТ, при мышечных и менструальных болях, как успокоительное средство
Болгария	Не указан	Соцветия	Отвары, компрессы	При болях в горле, воспалениях глаз, очищение лица, при воспалении половых органов
Юго-Восточная Албания	Kamilica Koromil	Соцветия, надземная часть	Чай, настои	При дискомфорте в кишечнике, диарее, при простуде, кашле, воспалении кожи и слизистых оболочек, при беспокойствах, в качестве жидкости для полоскания рта, при воспалении кожи, ожогах, расстройствах пищеварения, поражении печени, тревоге и бессоннице
Восточная Сербия	Bela rada, kamilica, podrumce	Соцветия	Настои	Для укрепления иммунной системы, при воспалении половых органов, для ухода за глазами и кожей, в качестве ароматизатора для шампуней, при простуде, как успокоительное, при конъюнктивите

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Греция	Намомілі	Соцветия	Настои, компрессы	При расстройствах ЖКТ, запорах, язвах, коликах, аллергии, при бессоннице, мигрени, при стрессе, при проблемах с кожей (воспаление, дерматит, акне, ожог, экзема, зуд, антисептик), при болях в горле, инфекции глаз, гингивите, в качестве жидкости для полоскания рта
Примечание – Составлено по источникам [35-55]				

В народной медицине применяются различные части ромашки аптечной, это стебель, листья, цветки и целиком все растение. Из них изготавливаются настои, отвары, ванночки и компрессоры. Например, в некоторых регионах Марокко в традиционной медицине в качестве лекарственного сырья используются цветки, листья и вся надземная часть *Ch. recutita*. Её готовят в виде настоев или отваров для лечения сахарного диабета, различных инфекций, диареи, нервных расстройств, стенокардии, стоматита, абсцесса и менструаций [35, р. 5515634-1-5515634-15; 36, р. 93-98; 37, р. 35-42; 38, р. 516-529; 39, р. 134-143]. В Испании из *Ch. recutita* изготавливают настои для лечения таких заболеваний, как гастралгия, расстройства пищеварения, инфекций женских половых органов и для лечения мочекаменной болезни [40, р. 87-104]. Кроме того, растение используется как противорвотное средство при тошноте и противовоспалительное средство при желудочно-кишечных расстройствах, также применяется как седативное, антисептическое средство и при раздражениях глаз [41, р. 609-617]. В Португалии соцветия *Ch. recutita* традиционно используется для лечения таких заболеваний, как ишиалгия, инфекции ротовой полости, горла, уха и кожи [42, р. 270-282]. В традиционной медицине Турции настои из ромашки аптечной используются против спазмов, колик, для лечения простуды и как успокаивающее средство [43, р. 118-151]. В Италии в народной медицине *Ch. recutita* широко используется как противовоспалительное средство при растяжениях связок, переломах костей, мышечных болях, при болях в ЖКТ и как успокоительное средство при раздражительности [44, р. 1-36]. Кроме того, ромашка аптечная проявляет успокоительные свойства, применяется при обесцвечивании волос [45, р. 568-585; 46, р. 328-341]. В некоторых странах восточной Европы настои из соцветий ромашки применяют для повышения иммунитета, против ожогов, болезней ЖКТ, печени, для лечения гинекологических заболеваний. В парфюмерно-косметической промышленности отвары и настои из ромашки входят в состав средств по уходу за кожей, при воспалении глаз, в средства по уходу за полостью рта, как доавбка в шампуни [47, р. 1020-1-102-11; 48, р. 278-288; 49, р. 25-32; 50, р. 1655-1673; 51, р. 803-809; 52, р. 704-712]. В Греции *Ch. recutita* используется также для лечения ЖКТ, глазных заболеваний, дерматитов [53], в Албании – при кашля, проблемах с желудком и кишечником [54]. В Болгарии растение используют при простудных заболеваниях, болях в горле, при воспалениях глаз и для очищения лица [55, р. 185-197].

Учеными ближнего и дальнего зарубежья был широко исследован фитохимический состав эфирных масел и экстрактов *Ch. recutita* и было идентифицировано более 120 компонентов. Определение фитохимического состава эфирных масел и экстрактов проводится обычно с использованием хроматографических методов. Выделяют эфирные масла в основном из цветков, поскольку они являются наиболее используемым органом растения. Как правило, основную группу соединений эфирных масел ромашки аптечной составляют терпеноиды, причем наиболее важными соединениями являются бисаболол и его оксиды А и В, оксид бисаболон А, хамазулен и β-фарнезен (рисунок 2), фенольные соединения (рисунок 3), флавоноиды (рисунок 4) и

кумарины (рисунок 5). Следует отметить, что на наличие вышеуказанных соединений влияют несколько факторов, таких как география места произрастания и окружающая среда [56, 57], сорта растений [58] и генетические факторы [59]. Также на химический состав ромашки аптечной влияют методы сушки [60], экстракции [61], наличие и концентрация салициловой кислоты и использование биоудобрений [62].

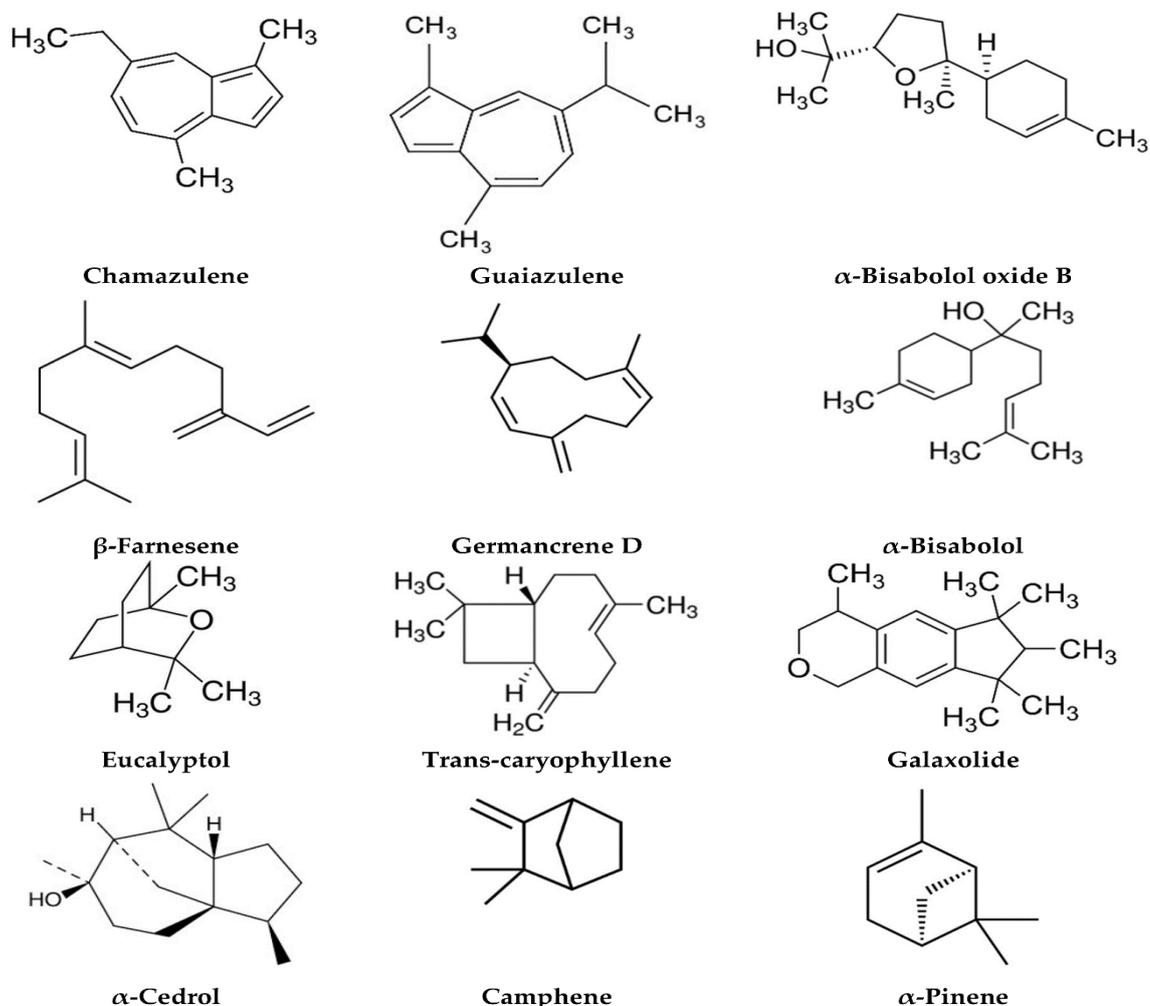


Рисунок 2 – Структура терпеноидов *Chamomilla recutita*

Примечание – Составлено по источнику [23, р. 479-3]

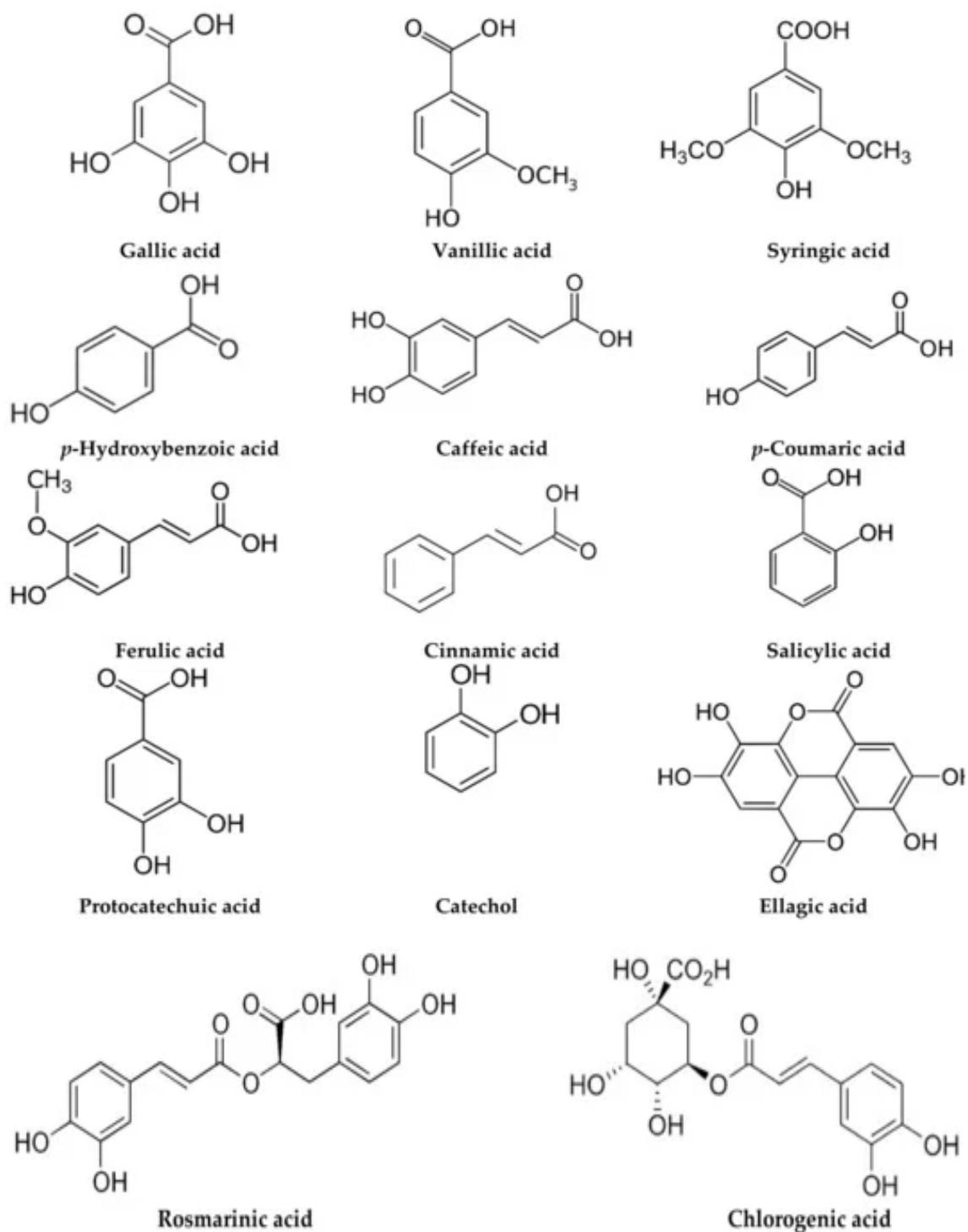
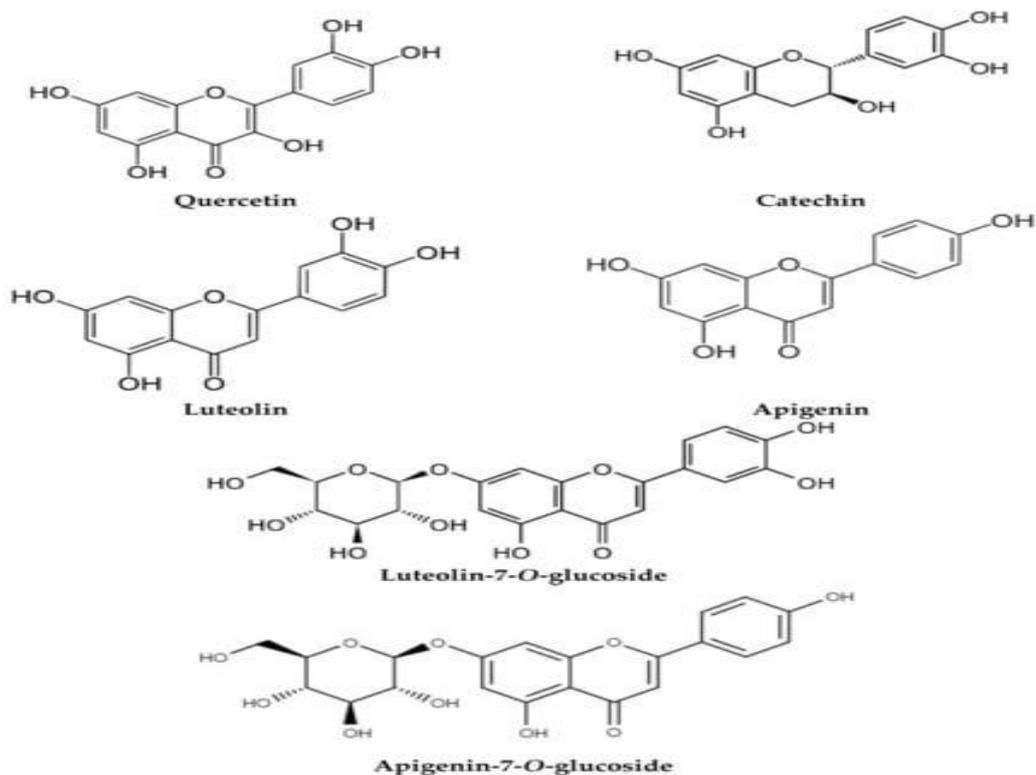
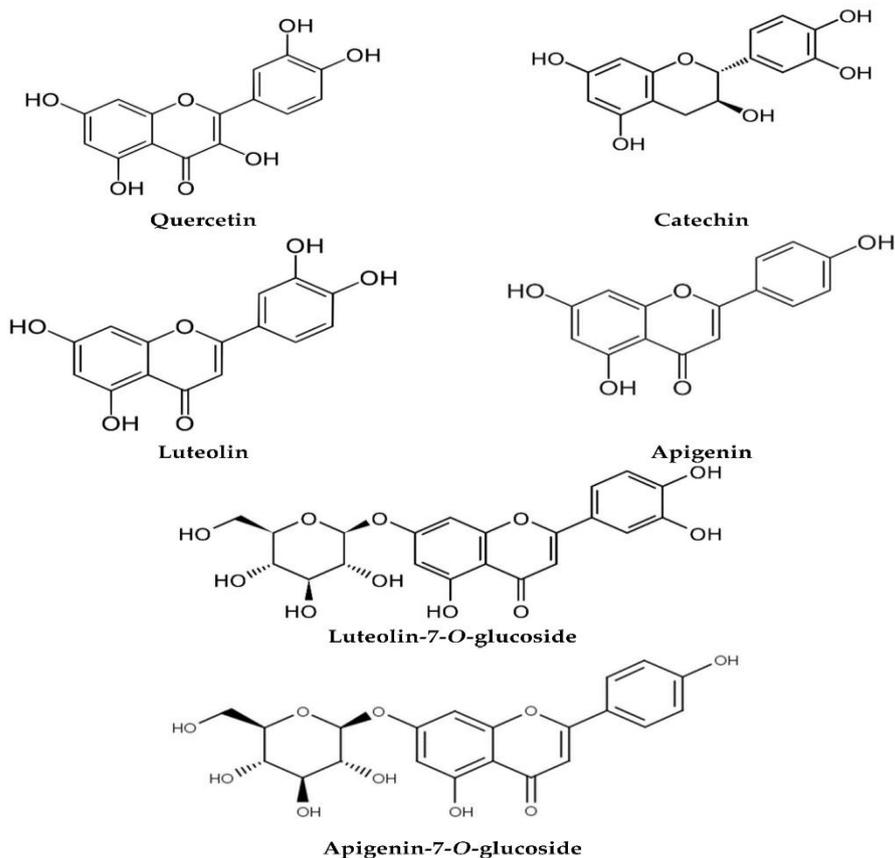


Рисунок 3 – Структура фенольных соединений *Chamomilla recutita*

Примечание – Составлено по источнику [23, р. 479-7]



a



б

Рисунок 4 – Структура флавоноидов *Chamomilla recutita*

Примечание – Составлено по источнику [23, р. 479-8]

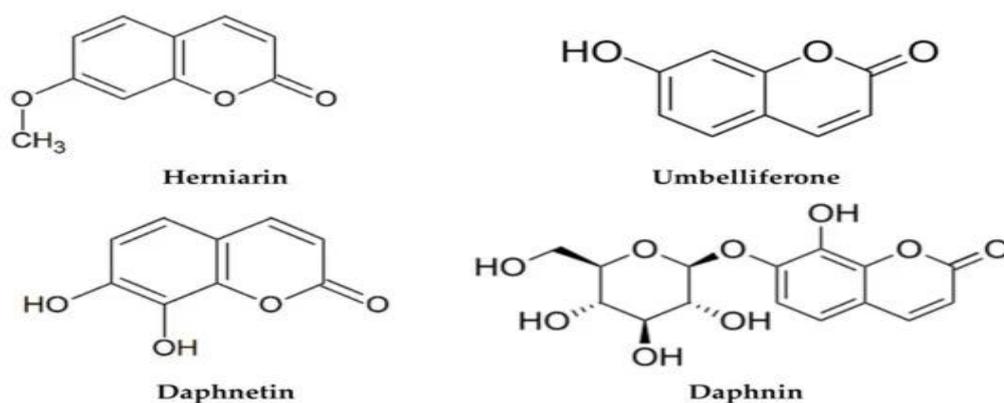


Рисунок 5 – Структура соединений кумаринов *Chamomilla recutita*

Примечание – Составлено по источнику [23, p. 479-9]

Химический состав эфирного масла может варьировать, что обусловлено отличиями в месте культивирования. Так, в ромашке аптечной из Марокко, эфирное масло включало порядка 24 компонентов. Мажорными являлись следующие: хамазулен (26,11%), цис-β-фарнезен (11,64%) и эвкалиптол (8,19%) [63]. Авторы Abbas и соавт. из Египта [60, p. 5083-1-5083-8] сравнили химический состав эфирного масла, полученного из свежих и сушеных цветков ромашки аптечной с использованием различных методов сушки (в тени, в печи, на солнце и в микроволновой печи). Результаты показали, что основным компонентом является оксид α-бисаболола А (33-50,5%). Методы сушки, использованные в данном исследовании, значительно повлияли на количество идентифицированных соединений, так 21 соединение было обнаружено после сушки на солнце и только 13 - после сушки в микроволновой печи. Также авторы EL-Nefny и соавт. сообщили о цис -β-фарнезене (27%), D-лимонен (15,25%) и α-бисабололоксид А (14,9%) [64] в качестве основных компонентов эфирного масла ромашки аптечной, произрастающей в Египте. Исследователи из Турции получили количественную разницу в химическом составе эфирного масла ромашки аптечной, произрастающей в двух регионах Конья и Караман с преобладанием α-бисаболола (27,36-38,6%), β-фарнезена (25,05-30,15%), и хамазулена (13,5-13,93%) [65]. Кроме того, Verechet и соавт. из Румынии обнаружили, что эфирное масло ромашки аптечной состоит в основном из сесквитерпенов (91,65%), в которых преобладает оксид бисаболола А (70,2%) [66]. Эфирное масло ромашки аптечной, произрастающей в Бразилии, образовано из 18 соединений, в основном из α-бисабололоксид В (26,08%), β-фарнезена (16,35%) и бисабололоксид А (14,7%) [67]. Культивируемая в Италии ромашка аптечная содержит в своем составе в основном α-бисабололоксид В (3,7-28,1%) [68]. Стоит отметить, что окружающая среда и место произрастание ромашки аптечной влияют на химический состав эфирного масла, т.е. на количественное содержание компонентов в составе эфирного масла. Так, в некоторых исследованиях сообщается о химическом составе эфирного масла ромашки аптечной, произрастающей в Иране, в которой преобладали в той или иной степени хамазулен, α-бисабололоксид А,

бисабололоксид А,  $\alpha$ -бисаболол, бисабололоксид В,  $\alpha$ -бисабололоксид В, цис-пинокамфон, транс- и цис - $\gamma$ -бисаболон или транс- $\beta$ -фарнезен [69-74]. Приведенный выше состав эфирного масла, варьировался от нескольких факторов, таких как метод экстракции, географических факторов, условий окружающей среды, в которой произрастает растение, от сортовых качеств, от концентрации салициловой кислоты и их взаимодействий. Также, как указывают некоторые авторы, использование биоудобрений, таких как суспензии цианобактерий также влияют на компонентный и количественный состав эфирного масла растения [62, р. 1231-1240]. Mavandi и соавт. в своих исследованиях провели сравнение эфирных масел, выделенных из шести местных образцов иранской *Ch. recutita* и двух немецких и венгерских сортов. Результаты показали, что в иранской ромашке компоненты эфирного масла принадлежали к трем хемотипам:  $\alpha$ -бисабололоксид А,  $\alpha$ -бисабололоксид В и  $\alpha$ -бисаболоноксид А. Компоненты эфирного масла немецких и венгерских сортов ромашки аптечной принадлежали к хемотипу  $\alpha$ -бисабололоксид А, что подтверждает зависимость состава от генетических особенностей вида [59, р. 1228-1239]. Авторы Orav и др. изучили состав эфирного масла в 11 странах и выявили ряд различий в их компонентном составе в зависимости от географии и климата. В составе эфирного масла образцов из Англии, Шотландии, Греции, Германии, стран Прибалтики преобладает бисабололоксида А, в странах восточной и южной Европы -  $\alpha$ -бисабололовый хемотип, на Кавказе - хемотип бисабололоксида В, в Украине - хемотип бисаболоноксид А [56, р. 48-54]. В ромашке, культивируемой в Австралии, содержатся в основном оксиды бисаболола В и А (27,5 и 27% соответственно) [75]. Кроме того, химический состав эфирного масла ромашки аптечной, получаемый для коммерческих целей в США отличается обилием транс - $\beta$ -фарнезена (42,59%) [76].

Авторами Abdalla и др. был проведен фитохимический анализ экстрактов *Ch. recutita*, который показал наличие аминокислот, кумаринов, фенольных соединений, стеролов, тритерпеноидов, танинов и алкалоиды (таблица 2) [77, 78]. Также, в работе Elsemelawy (Египет) показан состав экстракта, богатый флавоноидами (кверцетин и лютеолин-О-ацилгексозид) и фенольными кислотами (катехол, эллаговая и хлорогеновая кислоты) [79]. В водном экстракте преобладали также флавоноиды, как кверцетин, нарингенин и мирицетин, фенольные кислоты (бензойная, розмариновая) [77, р. 6-11]. В исследованиях Petruľová-Poracká и др. из Словакии сообщается о присутствии в метанольном экстракте трех кумаринов: скиммина (умбеллиферон-7-О- $\beta$ -D-глюкозид), дафнина (дафнетин-7-О - $\beta$ -D -глюкозид) и дафнетина (7,8 -дигидроксикумарин) [80]. Также сообщалось, что обработка ромашки аптечной этанофом повлияла на содержание кумарина, фенольной кислоты и флавоноидов в метанольном экстракте листьев [81]. Кроме того, исследования Kováčik и соавт. показали, что на содержание фенольной кислоты в листьях повлияло воздействие кадмия и меди. Также был затронут минеральный состав розеток листьев и корней [82].

Таблица 2 – Компонентный состав эфирных масел и экстрактов *Chamomilla recutita*

Страна	Используемая часть	Соединения, группы	Основные компоненты
1	2	3	4
<i>Эфирные масла</i>			
Марокко	Надземная часть	Терпеноиды, кумарины	Хамазулен (26,11%), цис-фарнезен (11,64%), эвкалиптол (8,19%), транс-кариофиллен (5,95%), галаксолид (5,31%), кумарин (6,01%)
Египет	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол оксид А (33-50,5%), $\alpha$ -бисаболол оксид В (8,2-15,4%), $\alpha$ -бисаболон оксид А (5,4-14,6%), хамазулен (1,9-5,2%)
Египет	Соцветия	Терпеноиды	Цис- $\beta$ -фарнезен (27%), D-лимонен (15,25%), $\alpha$ -бисаболол оксид А (14,9%)
Турция	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол (27,36-38,6%), $\beta$ -фарнезен (25,05-30,15%), хамазулен (13,5-13,93%), германкрен Д (4,35-6,11%)
Турция	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболола оксид А (29,7-33,7%), хамазулен (18,76-20%), $\alpha$ -бисаболола оксид В (8,881-14,8%), $\alpha$ -бисаболона оксид А (6,64-8,3%), $\alpha$ -бисаболол (0,91-2,01%)
Турция	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол оксид А (37,2-44,5%), $\alpha$ -бисаболон оксид А (11,7-16,5%), транс- $\beta$ -фарнезен (13,3-15,4%), ментол (0-13%), цис-спирозэфир (5,6-9,9%), $\alpha$ -бисаболол оксид В (3-7,1%)
Турция	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболол оксид А (7,31-51,31%), бисаболон оксид (8,35-39,97%), бисаболол оксид Б (3,18-35,7%), транс- $\beta$ -фарнезен (2,05-19,68%), спатуленол (0-9,46%)
Турция	Надземная часть	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол (17,51%), цис-транс-фарнезол (8,72%), $\beta$ -бисаболон (8,37%), транс- $\beta$ -фарнезен (5,48%), гвайазулен (4,36%), $\alpha$ -пинен (3,68%), лимонен (3,24%)
Иран	Соцветия	Терпеноиды	Хамазулен (31,2%), 1,8-цинеол (15,2%), $\beta$ -пинен (10,1%), $\alpha$ -пинен (8,14%), $\alpha$ -бисаболол (7,45%), терпинен-4-ол (4,11%)
Иран	Надземная часть	Терпеноиды	Цис-пинокамфон (не обнаружен-73,54%) $\alpha$ -оксид бисаболола А (7,97–62,16%), хамазулен (1,67–15,08%), транс- $\beta$ -фарнезен (1,24–12,87%)
Иран	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболона оксид А (45,64-65,41%), транс- $\gamma$ -бисаболон (не обнаружено - 42,76%), цис- $\gamma$ -бисаболон (не обнаружено - 40,08%), $\alpha$ -бисаболола оксид Б (не обнаружен - 21,88%), хамазулен (не обнаружен - 19,22%)
Иран	Соцветия	Терпеноиды	Транс- $\beta$ -фарнезен (24,19%), гвайазулен (10,57%), $\alpha$ -бисаболола оксид А (10,21%), $\alpha$ -фарнезен (8,7%), $\alpha$ -бисаболол (7,27%)
Иран	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболон оксид А (11,9-63,5%), $\alpha$ -бисаболол оксид А (10,6-37,9%), $\alpha$ -бисаболол оксид Б (2,4-23,9%)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Венгрия	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболола оксид А (40,7%), хамазулен (14,3%), $\alpha$ -бисаболона оксид А (12,8%), $\alpha$ -бисаболола оксид В (8,7%)
Германия	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол оксид А (39,1%), $\alpha$ -бисаболон оксид А (17,4%), $\alpha$ -бисаболол оксид В (17,1%), цис-енин-дициклоэфир (10,3%)
Германия	Соцветия	Терпеноиды	бисаболол оксид А (54,1%), цис-енин-дициклоэфир (19%), бисаболол оксид В (6,7%), бисаболон оксид А (4,5%)
Эстония	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболола оксид А (27,5-47,9%), бисаболона оксид А (1,6-17,1%), цис-енин-дициклоэфир (11,7-14,9%), бисаболол оксид В (9,9-12,3%)
Греция	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболол оксид А (41,9%), цис-енин-дициклоэфир (11,4%), бисаболол оксид В (6,4%)
Шотландия	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболол оксид А (55,6%), цис-енин-дициклоэфир (14%), оксид бисаболола В (8%), бисаболон оксид А (7,6%)
Англия	Соцветия	Терпеноиды	бисаболол оксид А (56%), цис-енин-дициклоэфир (13,3%), оксид бисаболола В (7,1%), бисаболон оксид А (4,3%)
Латвия	Соцветия	Терпеноиды	бисаболол оксид А (51,9%), цис-енин-дициклоэфир (13%), бисаболол оксид В (7,5%), транс- $\beta$ -фарнезен (5,3%)
Молдова	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол (44,2%), цис-енин-дициклоэфир (13,2%), бисаболон оксид А (12,4%), бисаболол оксид А (9,3%), оксид бисаболола В (6,6%)
Россия	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол (23,9%), бисаболол оксид А (16,4%), цис-енин-дициклоэфир (14,4%), бисаболол оксид В (10,5%), транс-неролидол (7,4%)
Чехия	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -Бисаболол (37%), цис-енин-дициклоэфир (26,1%), хамазулен (9,8%), транс- $\beta$ -фарнезен (4,5%)
Армения	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболол оксид В (27,2%), хамазулен (15,3%), бисаболол оксид А (12,6%), цис-енин-дициклоэфир (12,6%), бисаболон оксид А (11,2%)
Украина	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболон оксид А (24,8%), $\alpha$ -бисаболол (17,1%), бисаболол оксид А (12,3%), бисаболол оксид В (11%), цис-енин-дициклоэфир (8,8%)
Румыния	Соцветия	Терпеноиды	Оксид бисаболола А (70,2%), $\beta$ -фарнезен (6,47%), $\alpha$ -бисаболол оксид В (6,21%), цис-ланцеол (5,071%)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Бразилия	Соцветия	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол оксид В (26,08%), $\beta$ -фарнезен (16,35%), бисаболола оксид А (14,7%), $\alpha$ -бисаболол (7,91%)
Италия	Надземная часть	Терпеноиды	$\alpha$ -бисаболол оксид В (3,7-28,1%), $\alpha$ -бисаболола оксид А (2,7-19%), спатуленол (3,6-12,8%)
Австралия	Соцветия	Терпеноиды	Бисаболол оксид В (27,5%), бисаболола оксид А (27%), $\alpha$ -бисаболол (6,6%), цис-спироэфир (6,1%), фарнезен (4,5%), хамазулен (3,5%), транс-спироэфир (0,6%)
США	Коммерческий	Терпеноиды	Транс- $\beta$ -фарнезен (42,59%), бисаболол оксид А (21,2%), (Е,Е)- $\alpha$ -фарнезен (8,32%), $\alpha$ -бисаболона оксид А (4,53%), $\alpha$ -бисаболол оксид В (4,43%), гермакрин D (2,93%)
<i>Экстракты</i>			
Египет	Соцветия и корень	Флавоноиды, фенольные кислоты	Лютеолин О-ацилгексозид (2801,99 мд), кверцетин (1765,01 мд), эллаговая кислота (1582,81 мд), катехол (1104,49 мд), хлорогеновая кислота (937,48 мд)
Египет	Соцветия	Флавоноиды, фенольные кислоты	Мирицетин (1587,82 мд), кверцетин (927,72 мд), нарингенин (400,99 мд), бензойная кислота (414,88 мд), розмариновая кислота (370,59 мд)
Словакия	Листовые розетки	Фенольные кислоты	Феруловая кислота (196,8-512,5 мкг/г), кофейная кислота (66,8-106,1 мкг/г), ванилиновая кислота (45,6-71,1 мкг/г), хлорогеновая кислота (12,6-26,2 мкг/г), п-кумаровая кислота (14,4-26,1 мкг/г)
Словакия	Соцветия и листья	Кумарины	Е-GMCA (9,82-17,8 мг/г), Z-GMCA (5,84-16,1 мг/г), герниарин (0,41-2,06 мг/г), дафнин (0,142-0,257 мг/г), скиммин (0,13-0,23 мг/г), умбеллиферон (0,02-0,06 мг/г), дафнетин (следовые количества - 0,02 мг/г)
Словакия	Листья	Кумарины, фенольные кислоты	Е-GMCA (6,86-9,62 мг/г), Z-GMCA (1,22-6,6 мг/г), ванилиновая кислота (29,27-62,46 мкг/г), кофейная кислота (7,44-14,14 мкг/г)
Иран	Цветки	Флавоноиды	Лютеолин (2,2 мг/г), апигенин (1,19 мг/г)
Иран	Не указан	Алкан	Н-гептакозан (33,53%), 2,6,10,14,18,22-тетракозагексан (16,71%), 1,2,2-триметилциклопропиламин (13,76%), 7-метокси-2,3,4,5,6,7-гексагидро (6,13%), 1,2-бензолдикарбоновая кислота (5,99%), фенол, 4-(2-аминоэтил) (5,26%), гекс-5-ениламин (4,48), 3-фторфенетиламин (0,2%)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Пакистан	Не указан	Аминокислоты	L-пролин (185 мг/мл), L-аспарагин (97 мг/мл), аминомасляная кислота (52 мг/мл), L-аспарагиновая кислота (45 мг/мл), L-аланин (43 мг/мл), L-глутаминовая кислота (42 мг/мл)
Китай	Корни, стебли, Листья	Кофеилхиновая кислота	Изохлорогеновая кислота А (0,1-5,15 мг/г), хлорогеновая кислота (0,03-4,08 мг/г), изохлорогеновая кислота С (0,06-3,17 мг/г), изохлорогеновая кислота Б (0,03-2,45 мг/г), неохлорогеновая кислота (0,02-1,68 мг/г), криптохлорогеновая кислота (0,005-0,33 мг/г)
Китай	Соцветия	Аминокислоты	Пролин (4,24 мг/г), аланин (3,79 мг/г), изолейцин +лейцин (2,59 мг/г), аргинин + треонин (2,53 мг/г)
Примечание – Составлено по источникам [56, р. 48-54; 57, р. 1315-1-1315-13; 58, р. 56-1-56-13; 59, р. 1228-1239; 60, р. 5083-1-5083-8; 61, р. 2982-2983; 62, р. 1231-1240; 63, р. 883-887; 64, р. 809-1-809-11; 66, р. 2787-2794; 67, р. 171-175; 69, р. 437-440; 70, р. 79-87; 71, р. 531-536; 72, р. 124-129; 80, р. 54-58; 81, р. 5720-1-5720-15; 82, р. 231-241; 83-90]			

Самые высокие концентрации лютеолина и апигенина были получены из метанольных экстрактов ромашки из Ирана [57, p. 1315-1-1315-13]. Sayuag и соавт. сообщили о н-гептакосане (33,53%), высшем алкане, в качестве основного компонента этанольного экстракта ромашки аптечной [83, p. 1-9]. В ряде работ метод ВЭЖХ был использован для определения содержания кофейлхиновой кислоты в 34 образцах *Ch. recutita* из разных географических регионов Китая [84, p. 4352832]. Результаты исследования показали о наличие 6-ти фенольных кислот с преобладанием изохлорогеновой кислоты. Экстракты *Ch. recutita* также могут содержать аминокислоты, такие как пролин и аланин [85, p. 176-178]. Экстракт ромашки аптечной, произрастающей в Пакистане отличается преобладанием аминокислот пролина и аспарагина [86, p. 459-461].

### 1.3 Антиоксидантная активность

В зарубежной литературе встречаются исследования по изучению антиоксидантной активности эфирного масла и экстрактов *Ch. recutita*. Данные работы проводились с помощью нескольких тестов, включая 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (АБТС), железовосстанавливающую антиоксидантную способность (FRAP) (Таблица 3). Анализ ДФПГ наиболее широко используется для оценки антиоксидантной активности. В данном тесте, эфирные масла *Ch. recutita* спустя 90 минут реакции продемонстрировали самую высокую активность удаления ДФПГ [91]. Однако, имели меньшую активность, по сравнению со стандартным антиоксидантным препаратом бутилгидрокситолуолом (БГТ) и  $\alpha$ -токоферолом [92]. В работе Melo-Guerrero М.С. и др., тест АБТС был использован для исследования антиоксидантной активности эфирных масел ромашки аптечной, полученных различными методами экстракции (отпарка с водяным паром, гидродистилляция и др.) [93]. Результаты варьировались в зависимости от метода экстракции, при этом метод отпарки обеспечивал более высокую антиоксидантную активность в анализе АБТС. Данную особенность авторы объясняют изменением химического состава эфирных масел в зависимости от метода экстракции.

Авторами Formisano и др. была изучена антиоксидантная активность эфирных масел и экстрактов *Ch. recutita*, культивируемая в 13 регионах Италии. Использовались тесты 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) и также железовосстанавливающая антиоксидантная способность (FRAP). Результаты исследования показали высокую антиоксидантную активность, как эфирных масел, так и экстрактов. Но стоит отметить, что она варьировалась в зависимости от факторов окружающей среды и химического состава. Так наибольшую антиоксидантную активность проявляли эфирные масла, состав которой был богат кислородсодержащими соединениями, и экстракты с большим содержанием фенолов. Также авторы утверждают, что при использовании теста ДФПГ наибольшая активность наблюдалась у экстрактов. А при определении FRAP антиоксидантная активность эфирных масел и экстрактов была одинаково высокой [68, p. 256-262].

Таблица 3 – Показатели антиоксидантной активности эфирных масел и экстрактов *Chamomilla recutita*.

Используемая часть растения	Главный компонент	Метод исследования	Результаты
1	2	3	4
Эфирные масла			
Листья	Не указан	ДФПГ β-каротин-линолевая кислота	IC <sub>50</sub> = 4,18 мкг/мл Относительная антиоксидантная активность = 12,69%
Листья и соцветия	Энин-дициклоэфир (36,13-47,6%) Оксид бисаболола А (47,1%) β-фарнезен (30,2-37,62%)	АБТС	Эквивалентная антиоксидантная способность Trolox TEAC = 13.81-27.56 мкмоль ТЭ/мл
Соцветия	α-бисаболон оксид А (35,74%)	ДФПГ	IC <sub>50</sub> = 793.89 мкг/мл IC <sub>50</sub> = 1448.68 мкг/мл 34,21%
Соцветия	транс-β-фарнезен (29,8%)	ДФПГ	EC <sub>50</sub> = 2.07 мг/мл
Надземная часть	α-бисаболол оксид В (3,7-28,1%)	ДФПГ FRAP	Эквивалентная антиоксидантная способность Trolox TEAC = ~30-273.5 мкмоль ТЭ/100 г DW TEAC= ~35-657,1 мкмоль ТЭ/100 г DW
Экстракты			
Надземная часть+ Метанол	Содержание фенола (~390–2689,2 мг ЭГК/100 г)	ДФПГ FRAP	Эквивалентная антиоксидантная способность Trolox TEAC = ~260-881.1 мкмоль TE/100 г DW TEAC= 137.2-1200.3 мкмоль TE/100 г DW
Корень+ Метанол+Спирт этиловый	Не указан	ДФПГ	IC <sub>50</sub> = 82.8% IC <sub>50</sub> = 37.67%

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Растительный материал+Вода	Не указан	ДФПГ	41.3–49.5%
Надземная часть Корень Соцветия+ Метанол	Содержание фенола Цельная трава (37,1 мг/кг сухой массы) Стебель (23,6 мг/кг сухой массы) Соцветия (31,9 мг/кг сухой массы)	ДФПГ Эмульсия линолевой кислоты (30 ч) FRAP хелатирующая способность иона двухвалентного железа (FeII+)	Надземная часть: IC50 ~ 2,5 мкг/мл Стебель: IC50 ~ 2,4 мкг/мл Соцветия: IC50 ~ 2,35 мкг/мл. Надземная часть: 63% Стебель: 69% Соцветия: 60% Надземная часть: абсорбция ~1.8 Стебель: абсорбция ~ 0,88 Соцветия: абсорбция ~ 0,9 Надземная часть: 73% Стебель: 67% Соцветия: 85%
Листья+ Метанол	Не указан	ДФПГ β-каротин-линолевая кислота	IC50 = 1,83 мкг/мл Относительная антиоксидантная активность = 11,37%
Соцветия+ Этанол 50%	Содержание умбеллиферона (11,80 мг/100 г) Содержание герниарина (82,79 мг/100 г)	ДФПГ	45.4-61.5%
Соцветия+ Вода	Содержание фенола (0,207 мг ЭГК/г)	Ингибирование перекисного окисления липидов	Ингибирование = 44,15%
Примечание – Составлено по источникам [68, p. 256-262; 91, p. 2017-2027; 92, p. 224-231; 93, p. 845-855; 94-99]			

В таблице 3 приведены исследования зарубежных авторов по антиоксидантной активности эфирных масел и экстрактов *Ch. recutita*.

#### **1.4 Антибактериальная активность**

Наиболее часто используемым методом для проверки антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений является метод диффузии в агар с использованием дисков или лунок. Используя данный метод, многие авторы изучили антибактериальную активность эфирного масла ромашки аптечной. Так, из литературных данных следует, что наиболее чувствительными штаммами к эфирному маслу ромашки являются Стафилококк золотистый, Бацилла субтилис, Бацилла церей, Эшерихия коли, нескольких видов *Streptococcus*, также снижается рост Энтерококк фекалис [100-107]. Наиболее устойчивыми являются Псевдомонада аэругиноза, но тем не менее, эфирное масло *Ch. recutita* смогло уменьшить образование биопленки и синтез альгината, продемонстрировав эффективность в борьбе с продуцирующими биопленку бактериями [100, р. 65-130]. Исследования показали, что грамположительные бактерии показали наименьшие значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Эти результаты можно объяснить различиями в структуре клеточной стенки, поскольку грамотрицательные бактерии имеют сложную и жесткую мембрану, богатую липополисахаридами, что ограничивает доступ противомикробных молекул [101, р. 1510-1513].

В исследованиях Höferl и др. выявил влияние места произрастания ромашки аптечной на ее антибактериальную активность. Например, наибольшую активность (МИК = 2000 мкг/мл) в отношении большинства бактерий проявляло эфирное масло ромашки аптечной из Южной Африки (18,7% транс - $\beta$ -фарнезена), Венгрии (38,3%  $\alpha$ -бисаболола) и Марокко [108].

Данные некоторых литературных источников показывают, что рост антибактериальной активности коррелирует с ростом концентрации эфирного масла и водных экстрактов [109, 110].

В таблице 4 представлена информация о противомикробной активности *Ch. recutita*.

Таблица 4 – Исследования антибактериальной активности эфирного масла и экстракта *Chamomilla recutita*

Используемая часть растения	Основной компонент	Метод определения	Тестируемый организм	Результат
1	2	3	4	5
<i>Эфирные масла</i>				
Листья	Не указан	Дисковая диффузия Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Бацилла церей LMG 13569 Листерия иннокюя LMG 1135668 Стафилококк золотистый ATCC 9244 Стафилококк каморум LMG 13567 <i>Стрептококк пиогенес</i> <i>Грамотрицательные</i> Энтерококк фекалис СІР 103907 Эшерихия коли СІР 11609 Сальмонелла энтерика СІР 105150 Шигелла дизентерийная СІР 5451 Протеус миробилис 104588 СІР Псевдомонада аэругиноза	Φ = 17 мм; МИК = 4; МБК = 4 мкг/мл Φ = 20 мм; МИК = 2; МБК = 2 мкг/мл Φ = 21 мм; МИК = 2; МБК = 2 мкг/мл Φ = 22 мм; МИК = 2; МБК = 2 мкг/мл Φ = 24 мм; МИК = 2; МБК = 2 мкг/мл Φ = 14 мм; МИК = 4; МБК = 8 мкг/мл Φ = 14 мм; МИК = 4; МБК = 8 мкг/мл Φ = 20 мм; МИК = 2; МБК = 2 мкг/мл Φ = 25 мм; МИК = 1; МБК = 1 мкг/мл Φ = 17 мм; МИК = 4; МБК = 4 мкг/мл Φ = 30 мм; МИК = 1; МБК = 1 мкг/мл
Надземная часть	Хамазулен (26,11%)	Метод микроразбавления, диффузия в диски	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый Бацилус субтилис <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли (АТВ:57) В6N Псевдомонада аэругиноза	Φ = 14.13 мм; МИК = 8.33 мкг/мл Φ = 15.2 мм; МИК = 6.25 мкг/мл Φ = 13.27 мм; МИК = 8.33 мкг/мл Φ = 13.07 мм; МИК = 8.33 мкг/мл

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Цветки	Не указан	Дисковая диффузия (0,78–100%)	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС-25923 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли АТСС-25922 Псевдомонада аэругиноза АТСС	Φ = 8.55–38.34 мм; МИК = 6.25% Φ = 9.31–12.32 мм; МИК = 1.56% Нет ингибирования
Надземная часть	транс-β-фарнезен (18,7–38,5%) α-бисаболол (38,3%) α-бисаболол оксид А (25%)	Макроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 6538 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли АТСС 25922 Сальмонелла абони АТСС 6017 Псевдомонада аэругиноза АТСС 9027	МБК = 2000–8000 мкг/мл МБК = 2000–8000 мкг/мл МБК = 2000–8000 мкг/мл МБК = 4000–8000 мкг/мл
Надземная часть	α-бисаболол оксид (38%)	Дисковая диффузия Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый Бацилла церей Бацилус субтилис <i>Грамотрицательные</i> Шигелла дизентерийная Шигелла сонне Псевдомонада аэругиноза	Φ=30 мм; МИК=0.011; МБК=0.13 мкг/мл Φ=36 мм; МИК=0.022; МБК=1.5 мкг/мл Φ=32 мм; МИК=0.03; МБК=1.5 мкг/мл Φ = 25 мм; МИК = 0.14; МБК = 3 мкг/мл Φ = 19 мм; МИК = 0.2; МБК = 3 мкг/мл Φ = 19 мм; МИК = 4; МБК = 8 мкг/мл Φ = 16 мм; МИК = 0.15; МБК = 3 мкг/мл
Цветки	α-бисаболон оксид А (35,74%)	Микроразбавление, диффузия дисковая	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 25923 Энтерококк фекальный АТСС 14506 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли АТСС 25922	Φ = 71.59%; МИК = 0.25 мг/мл Φ = 106.7%; МИК = 0.12 мг/мл Φ = 99.66%; МИК = 0.17 мг/мл Φ = 89.15%; МИК = 0.21 мг/мл Φ = 108.77%; МИК = 0.04 мг/мл

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
			Протеус вульгарис ATCC 33420 Псевдомонада аэругиноза ATCC27853	
Цветки	гвайазулен (25,6%)	(0,2–0,5 мкг/мл) Дисковая диффузия Формирование биопленки Количественный анализ альгината	<i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза 8821М	Нет ингибирования Формирование биопленки = 0,17–0,64 мкг/мл. Синтез альгината = 190,33–549,33 мкг/мл.
Цветки	гвайазулен (25,6%)	Дисковая диффузия Макроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стрептококк пиогенный RTCC 1447 Стрептококк мутанс RTCC 1601 Стрептококк фекальный ATCC 29212 Стрептококк сангуис RTCC 1449	Φ = 9 мм; МИК = 0.1; МБК = 0.2 мкг/мл Φ=10 мм; МИК = 0.5; МБК = 1.5 мкг/мл Φ = 0.8 мм; МИК = 4; МБК = 7 мкг/мл Φ = 8 мм; МИК = 0.5; МБК = 1 мкг/мл
Коммерческий	Бисаболон и транс-β-фарнезен	Макроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (16 штаммов) Стафилококк золотистый (2 ATCC штаммов) Стафилококк эпидермидис ATCC 12228 Энтерококк фекальный ATCC 51299 Устойчивые к ванкомицину энтерококков (9 штаммов)	МИК = 2->4; МБК = 2->4% МИК = МБК >4% МИК = МБК >4% МИК = МБК >4% МИК = МБК >4%

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Надземная часть	транс-β-фарнезен (42,2%)	Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 29213 Бацилла церей АТСС 14579 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли АТСС 10798 Псевдомонада аэругиноза АТСС 27853	МИК = 313 мкг/мл МИК = 625 мкг/мл МИК = 625 мкг/мл МИК = 313 мкг/мл
Цветки	Не указан	Дисковая диффузия Разведение в жидкой питательной среде (бульоне) Ex vivo	<i>Грамотрицательные</i> Энтерококк фекалис	Снижение Φ = 2,91 мм на 14-й день.
Цветки	транс-β-фарнезен (29,8%)	Дисковая диффузия	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый WDCM 00032 Листерия моноцитогенес WDCM 00020 Сальмонелла энтерика WDCM 00030 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли WDCM 00013 Псевдомонада аэругиноза WDCM 00024	Φ = 40 мм Φ = 13.33 мм Φ = 25 мм Φ = 31 мм Нет ингибирования
Не указан	Хамазулен (31,48%)	Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый (16 штаммов) <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли (16 штаммов)	МИК <sub>90%</sub> = 2.9 мг/мл МИК <sub>90%</sub> = 28.2 мг/мл

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Цветки	$\alpha$ -бисаболол оксид А (48,22%)	Дисковая диффузия Макроразбавление	Грамположительные Бацилла церей ATCC 11778 Стафилококк золотистый ATCC 13565 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли O157 ATCC 1659 Сальмонелла тифи ATCC 13076	$\Phi$ =12-22 мм; МИК = 10 мкг/мл $\Phi$ =12-26 мм; МИК = 10 мкг/мл $\Phi$ =7-19.5 мм; МИК = 12.5 мкг/мл $\Phi$ =10-21 мм; МИК = 12.5 мкг/мл
<i>Экстракты</i>				
Коммерческий Надземные части Метанол Этиловый спирт Петролейный эфир	Не указан	Метод диффузии в лунки агара	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый ATCC 25923 Бацилла субтилис NCTC 8236 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли ATCC 25922 Псевдомонада азругиноза ATCC 27853	Метанол: без ингибирования Этанол: $\Phi$ = 19 мм Петролейный эфир: $\Phi$ = 25 мм Метанол: $\Phi$ = 17 мм Этанол: $\Phi$ = 17 мм Петролейный эфир: $\Phi$ = 26 мм Метанол: $\Phi$ = 17 мм Этанол: $\Phi$ = 20 мм Петролейный эфир: $\Phi$ = 23 мм Метанол: $\Phi$ = 17 мм Этанол: $\Phi$ = 18 мм Петролейный эфир: $\Phi$ = 22 мм
Цветки Этиловый спирт	Не указан	Бульонное микроразведение	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (30 штаммов)	МИК = 64-128 мкг/мл
Листья Метанол	Не указан	Дисковая диффузия Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Бацилла церей LMG 13569 Листерия иннокуа LMG 1135668	$\Phi$ =17 мм; МИК=100; МБК=100 мкг/мл $\Phi$ =20 мм; МИК=100; МБК > 100 мкг/мл $\Phi$ =16 мм; МИК=100; МБК=100 мкг/мл $\Phi$ =19 мм; МИК=100; МБК=100 мкг/мл $\Phi$ = 18 мм; МИК = 25; МБК = 50 мкг/мл

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
			<p>Стафилококк золотистый АТСС 9244 Стафилококк каморум LMG 13567 Стрептококк пиогенес Энтерококк фекалис СІР 103907 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли СІР 11609 Сальмонелла энтерика СІР 105150 Шигелла дизентерийная СІР 5451 Протеус мирабилис 104588 СІР Псевдомонада аэругиноза</p>	<p>Ф=13 мм; МИК=100; МБК=100 мкг/мл Ф = 17 мм; МИК = 25; МБК = 25 мкг/мл Ф=17 мм; МИК=100; МБК = 100 мкг/мл Ф = 22 мм; МИК = 25; МБК = 25 мкг/мл Ф = 15 мм; МИК = 50; МБК = 50 мкг/мл Ф = 20 мм; МИК = 25; МБК = 25 мкг/мл</p>
Цветки Этанол	Не указан	<p>Метод диффузии в лунки агара (3,12-50 мг/мл) Микроразбавление</p>	<p><i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (14 штаммов) Стафилококк золотистый MRSA (6 штаммов) Стафилококк золотистый АТСС 29213 <i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза АТСС 27,853 (16 штаммов)</p>	<p>Ф = 10,3-12,7 мм при 25-50 мг/мл МИК = 6,25; МБК = 12,5 мг/мл Ф = 12,3 мм при 50 мг/мл МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл Ф = 12,1 мм при 50 мг/мл МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл Нет ингибирования</p>
Листья Спирт этиловый	Не указан	<p>Метод диффузии в лунки агара (3,12-50 мг/мл) микроразбавлением</p>	<p><i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (7 штаммов)</p>	<p>Ф = 10,1 мм при 50 мг/мл МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл Ф = 9,8 мм при 50 мг/мл МИК - МБК &gt; 50 мг/мл</p>

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
			Стафилококк золотистый АТСС 29213 <i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза АТСС 27,853 (16 штаммов)	Нет зоны; МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл
Цветки Спирт этиловый	Фенилиндолизин (32,82%)	Метод диффузии в лунки агара Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 25923 <i>Грамотрицательные</i> Энтерококк фекалис Эшерихия коли АТСС 25922	Φ = 15 мм; МИК = 6,75 мг/мл Ингибирование Ингибирование Нет ингибирования
Листья и цветки Метанол Водный раствор Хлороформ	Содержание фенола 13,11 мг ЭГК/г СхВ 23,96 мг ЭГК/ г СхВ 9,68 мг ЭГК/ г СхВ	Дисковая диффузия	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 6538 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли АТСС 4157	Метанол: Φ = 6 мм Водный раствор: Φ = 10 мм Хлороформ: без ингибирования Метанол: Φ = 22,5 мм Водный раствор: Φ = 9 мм Хлороформ: Φ = 10,33 мм
Цветки Спирт этиловый Циклогексан	Не указан	Дисковая диффузия Разведение бульона	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 25923 <i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза АТСС 27853 Эшерихия коли АТСС 25922 Сальмонелла тифимуриум АТСС 14028	Нет ингибирования Этанол: Φ = 10 мм; МИК = 1000 мг/мл Нет ингибирования Нет ингибирования

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Цветки Спирт этиловый	Фенольное содержание (151,45 мг ЭХК/мл)	Метод микроразбавления	<i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли	МИК = 39.1 мкг/мл
Цветки Спирт этиловый	Не указан	Метод диффузии в лунки агара (10–100 мкг/мл)	Грамположительные Стафилококк золотистый	Ф = 0-28 mm
Цветки Спирт этиловый (70, 96, 99,8%) Этилацетат	Не указан	Микроразбавление	<i>Грамотрицательные</i> Хеликобактер пилори АТСС 43504	Спирт этиловый: МИК = 62,5; МБК = 125-250 мкг/мл Этилацетат: МИК = 31,3; МБК = 125 мкг/мл
Цветки Метанол	Содержание фенола (656.1 мг ЭХК/г СвВ)	Диффузия (50 мг/мл) Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый АТСС 6538 р <i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза АТСС 9027	Ф = 1.3 мм; МИК = 62.5 мкг/мл Ф = 0.3 мм; МИК = 500 мкг/мл
Надземная часть Водный раствор	Не указан	Метод диффузии в лунки агара (5-40 мг/мл)	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли	Ф = 0.6-3.55 мм Ф = 0.6-3.6 мм
Стебли Листья Водный раствор	Не указан	Дисковая диффузия	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый Бацилла субтилис <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли Псевдомонада аэругиноза	Стебли: Ф = 22,7 мм Листья: Ф = 21,8 мм Стебли: Ф = 9,2 мм Листья: Ф = 23,9 мм Стебли: Ф = 9,9 мм Листья: Ф = 23,7 мм Стебли: Ф = 27,4 мм Листья: Ф = 24,9 мм

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Листья Цветки Спирт этиловый	Не указан	Метод диффузии в лунки агара Микроразбавление	<i>Грамотрицательные</i> Псевдомонада аэругиноза обладает множественной лекарственной устойчивостью	Листья: Без зоны МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл Цветки: Без ингибирования
Цветки Метанол Спирт этиловый Гексан Диэтиловый эфир	Содержание фенола (3.7 мг ЭГК/г) (3.5 мг ЭГК/г) (2.4 мг ЭГК/г) (3.3 мг ЭГК/г)	Дисковая диффузия (7,5-20 мкг/диск) Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Бацилла церей ATCC 11778 Стафилококк золотистый ATCC 13565 <i>Грамотрицательные</i> Эшерихия коли O157 ATCC 1659 Сальмонелла тифи ATCC 13076	Метанол: Ф=9-20 мм; МИК=12,5 мкг/мл Этанол: Ф=10-20 мм; МИК=12,5 мкг/мл Гексан: Ф=9-21 мм; МИК=12,5 мкг/мл Диэтиловый эфир: Ф=7-18 мм; МИК=15 мкг/мл Метанол: Ф=11-19 мм; МИК=12,5 мкг/мл Этанол: Ф=13-23 мм; МИК=12,5 мкг/мл
Цветки Спирт этиловый	Не указан	Метод диффузии в лунки агара (3,12-50 мг/мл) Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (14 strains) Стафилококк золотистый MRSA (6 strains)	Ф = 10,3-12,7 мм при 25-50 мг/мл МИК = 6,25; МБК = 12,5 мг/мл Ф = 12,3 мм при 50 мг/мл МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл
Листья Этиловый спирт	Не указан	Метод диффузии в лунки агара (3,12-50 мг/мл) Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый MRSA (7 strains) Стафилококк золотистый ATCC 29213	Ф = 10,1 мм при 50 мг/мл МИК = 12,5; МБК = 25 мг/мл Ф = 9,8 мм при 50 мг/мл МИК-МБК > 50 мг/мл
Листья Метанол	Не указан	Метод диффузии в лунки агара Микроразбавление	<i>Грамположительные</i> Стафилококк золотистый ATCC 6538P Бацилла субтилис MTCC 736	Ф = 6 мм; МИК = 0,156 мг/мл Нет ингибирования Нет ингибирования Нет ингибирования

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
			<i>Грамотрицательные Эшерихия коли ATCC 8739</i>	
<p>Примечания:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. МИК - Минимальная ингибирующая концентрация.</li> <li>2. МБК - Минимальная бактерицидная концентрация.</li> <li>3. ЭГК - Эквивалент галловой кислоты.</li> <li>4. ЭХК - Эквивалент хлорогеновой кислоты.</li> <li>5. СхВ - Сухой вес.</li> <li>6. СвВ - Свежий вес.</li> <li>7. Составлено по источникам [63, p. 883-887; 73, p. 1784-1791; 78, p. 8-11; 92, p. 224-231; 97, p. 1512-1516; 101, p. 1510-1513; 104, p. 11-1-11-11; 105, p. 34-38; 106, p. 1453-156; 107, p. 279-283; 108, p. e114-e120; 109, p. 437-444; 111-124]</li> </ol>				

### 1.5 Противовоспалительная активность

Хорошо известно о противовоспалительном эффекте *Ch. recutita*. Согласно результатам зарубежных ученых, противовоспалительной активностью обладает спиртовой экстракт *Ch. recutita*. Механизм данного эффекта авторы связывают со снижением продукции оксида азота (в макрофагах) и с индукцией продукции противовоспалительных цитокинов (в лимфоцитах) [125].

Авторы Singh и др. исследовали противовоспалительные свойства экстракта чая *Ch. recutita*. Результаты показали, что экстракт вызывает ингибирование денатурации белков и стабилизацию мембраны эритроцитов человека, что указывает на его противовоспалительные свойства [99, p. 3543-3550].

Исследования противовоспалительной активности *Ch. recutita* также проводились и на животных. Так, согласно исследований Wu и др., летучие и нелетучие компоненты *Ch. recutita* (эфирное масло, водный экстракт) могут уменьшать ксилоловый отек ушей у мышей, а также каррагининовый отек лапок крыс [126]. Авторы Nargesi и др. изучали влияние водно-спиртового экстракта *Ch. recutita* на уровень воспалительных показателей крови у крыс [127]. Результаты исследования показали, что лечение водно-спиртовым экстрактом при дозе 110 мг/кг, предотвращает значительное повышение в сыворотке у крыс уровня фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), С-реактивного белка, интерлейкина 6 и фибриногена.

### 1.6 Противоопухолевое действие

Экстракты и эфирные масла *Ch. recutita* также изучались на предмет их противоопухолевых свойств на нескольких линиях раковых клеток. Так, автором Ali была оценена противораковая активность эфирного масла *Ch. recutita* на клеточной линии карциномы молочной железы человека (MCF-7) [128]. Результаты показали, что эфирные масла ингибируют пролиферацию клеток дозозависимым образом, с 89% ингибированием после 24-часового воздействия при самой высокой концентрации, 640 мкг/мл. Автором Romeilah была протестирована противораковая активность эфирного масла ромашки аптечной против двух видов клеточных линий промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60 и NB4) [129]. Компоненты эфирного масла были способны ингибировать рост данных клеток. В литературе также есть информация о положительном антипролиферативном действии водно-спиртового экстракта *Ch. recutita* на клетки рака молочной железы человека [130, 131]. Экстракт был получен из надземных частей и корней ромашки аптечной. Авторы Fraihat и др. протестировали метанольный экстракт *Ch. recutita* на двух линиях опухолевых меланоцитов человека, A375.S2 и WM1361A [132]. Результаты показали ингибирование только пролиферации меланотической клеточной линии WM1361A. Svetanovi'c и др. обнаружили, что противораковая эффективность ромашки зависит от метода экстракции [133]. Их исследования показали, что водные экстракты имеют наиболее эффективную цитотоксическую активность в отношении линии клеток фибробластов мыши, линии клеток карциномы

шейки матки человека и линии клеток рабдомиосаркомы человека. В своей работе Wu оценил противоопухолевый потенциал водного экстракта *Ch. recutita*, полученного из семян при различных рН-условиях в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха [134]. Результаты исследования показали, что водный экстракт в концентрациях 300, 600 и 900 мкг/мл ингибируют рост клеток асцитной карциномы Эрлиха. В литературных источниках механизм противоракового действия *Ch. recutita* объясняется тем, что экстракты вызывают апоптоз и некроз онкогенных клеток, а также снижают способность клеток к миграции и инвазии [130, p. 87-94; 134, p. 37-40].

### 1.7 Противогрибковая активность

В литературных источниках сообщалось о высокой эффективности *Ch. recutita* против различных штаммов грибов. В основном изучалось влияние эфирного масла данного растения на кандиду (*Candida* sp.). Так, Höferl et al. обнаружили, что эфирные масла *Ch. recutita* с различных мест произрастания были способны ингибировать рост *C. albicans*, за исключением эфирных масел, полученных из культивируемых индийских растений, в которых доминировал  $\alpha$ -бисаболоксид А (25%) [108, p. e114-e120]. Это отражает влияние *Ch. recutita* на противогрибковую активность в зависимости от мест произрастания и химического состава. Другие исследования показали, что *C. albicans* более чувствителен к эфирным маслам ромашки, чем *Aspergillus* sp. [97, p. 1512-1516; 106, p. 1453-1456]. В свою очередь, EL-Hefny et al. [64, p. 809-1-809-11] обнаружили, что противогрибковая эффективность против *A. niger* зависит от принимаемой дозы эфирного масла. Аналогично своим результатам по антибактериальной активности, Mekonnen et al. сообщили об отсутствии влияния эфирных масел *Ch. recutita*, произрастающих в Эфиопии, на два штамма *Aspergillus* sp. и два штамма *Trichophyton* sp. [135].

Если сравнивать противогрибковую способность эфирных масел и экстрактов *Ch. recutita*, то можно сказать, что эфирные масла обладают большей активностью, чем экстракты [97, p. 1512-1516]. В свою очередь, Roby и др. обнаружили, что эфирные масла и различные экстракты на основе метанола, этанола, диэтилового эфира и гексана проявляют свою активность в зависимости от дозы [109, p. 437-444]. При сравнении экстрактов на основе хлороформа, метанола и воды, только экстракт на основе хлороформа проявлял наибольшую противогрибковую активность, особенно в отношении *C. albicans* и *Fusarium* sp. [115, p. 126-138]. Автор Nameed et al. обнаружил, что метанольный растительный экстракт *Ch. recutita* оказывает ингибирующее действие на *A. terreus* [136], в то же время Lavanya et al. сообщили об отсутствии активности против четырех штаммов *Candida* sp. (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* и *C. krusei*) [137]. Спиртовой экстракт из цветов *Ch. recutita* также показал противогрибковую активность [133, p. 582-590]. Показано, что водно-спиртовой экстракт вызывал значительное снижение роста *Saccharomyces cerevisiae* [138]. Аналогично водные экстракты также проявляли противогрибковую активность [139, 140].

### 1.8 Противопаразитарное и инсектицидное действие

Рядом ученых изучалась способность эфирных масел и экстрактов *Ch. recutita* ингибировать рост и развитие некоторых видов паразитов и насекомых. Так, была проведена оценка лейшманицидной активности эфирных масел *Ch. recutita*, произрастающая в Тунисе [141]. Исследования показали, что эфирные масла проявляли хорошую активность в отношении *Leishmania amazonensis* и *L. infantum*. Авторы объясняют данный эффект тем, что  $\alpha$ -бисаболол способен активировать запрограммированную гибель клеток на стадии промастигот. В исследованиях Hajaji et al., также показана активность  $\alpha$ -бисаболола в отношении *Acanthamoeba castellanii* [142].

Была изучена инсектицидная активность эфирных масел *Ch. recutita*. Так, эфирные масла показали хорошую ларвицидную активность в отношении *Chaoborus plumicornis*, инсектицидную активность в отношении *Drosophila melanogaster*, *Schistocerca gregaria*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Aedes aegypti*, нематоцидную активность в отношении *Caenorhabditis elegans*, *Artemia salina*, *Anasakis* L3 (100% смертность), антиакантамёбную активность в отношении *Acanthamoeba castellanii*, антигельминтную активность в отношении *Haemonchus contortus* [143-147].

### 1.9 Интродукция

*Chamomilla recutita*, или ромашка аптечная, издавна и до сегодняшнего дня включена в фармакопеи многих стран мира, включая отечественную фармакопею. Это традиционное и популярное лекарственное растение, которое выращивалось в СССР с 1847 года [148].

Ромашка аптечная широко распространена практически по всему миру. Она растет как сорняк на полях, огородах, в садах, на пустырях, свалках, вдоль дорог и вблизи населенных пунктов. В Казахстане аптечная ромашка не образует естественных зарослей.

Производством лекарственного растительного сырья в бывшем СССР занимались специализированные совхозы и опытные станции ВИЛАР, где ежегодно выращивалось более 40 тыс. тонн лекарственных растений [149].

Мировые показатели производства лекарственных и ароматических растений еще выше. Лидируют в этой сфере страны Западной Европы (Германия, Румыния, Чехия, Болгария, Польша, Италия, Дания), а также США, Япония, Индия. В последние годы увеличивают объемы производства Китай, Турция, Иран и Пакистан.

В Германии объем промышленного производства *Ch. recutita* достигает 70% всего объема лекарственных растений. Традиционно ромашку выращивают в Тюрингии (502 га), Саксонии (178 га) и Гессене (180 га). Германия также импортирует 400 тонн сырья из Аргентины, Египта, Венгрии и Балканских стран.

Под Мюнхеном на плантациях Баварского государственного института по культуре и защите растений *Ch. recutita* успешно культивируется на

болотистых почвах. Исследования на Корнейбургской опытной станции показали, что наибольшая урожайность достигается на нейтральных или слабощелочных почвах (рН 7,3-8,1).

Франция экспортирует 14,8 тонн цветков ромашки аптечной, Венгрия и Румыния также являются крупными экспортёрами.

В России значительная часть сырья ромашки аптечной поступает с промышленных плантаций, но удовлетворяет лишь половину медицинской потребности, которая в последние годы резко возросла (до 3 тыс. тонн).

В Казахстане промышленное выращивание и селекционное изучение ромашки слабо развиты, что делает интродукцию и получение высококачественных урожаев актуальной задачей.

В странах бывшего СССР ромашку выращивали в совхозах объединения «Союзлекраспром», в Прибалтике, Белоруссии, на Украине, в Молдавии, на Северном Кавказе, в Подмосковье и Западной Сибири [150].

### **1.10 Сорты ромашки аптечной**

В повышении урожайности возделываемых культур большое значение имеет селекция.

В 60-80 гг. XX века в странах ближнего и дальнего зарубежья активно проводилась селекция ромашки аптечной [151, 152]. В основном использовался метод экспериментальной полиплоидии при помощи химического и физического мутагенеза. Например, полиплоидные сорта получали при воздействии на проростки 0,2%-м водным раствором колхицина в течение 2-4 часов [153]. Данным методом в Венгрии был получен диплоидный сорт ромашки аптечной “Budakaralaszr” и тетраплоидный сорт “Degumilla” [154, 155].

В Польше был создан сорт ромашки аптечной «Златы-Лан» с высокой урожайностью, с повышенным содержанием эфирного масла и хамазулена. Методом химического мутагенеза в Швейцарии был выведен сорт ромашки аптечной “Manzana”, “Vesyr”, “Bona” с повышенным содержанием эфирного масла, хамазулена и бизаболола [156-158].

В Болгарии был создан диплоидный и тетраплоидный сорт ромашки аптечной «Лазура». Обнаружено, что у тетраплоидных сортов процентное содержание флавоноидов и хамазулена выше, чем у диплоидных [159].

В Словакии были выведены диплоидные сорта ромашки аптечной «Novbona», «LIANKA» (университет Пресова) с высоким содержанием  $\alpha$ -бисаболола, хамазулена и  $\alpha$ -бисабололоксида. Также выведены тетраплоидные сорта «Lutea» и «Goral». Данные сорта характеризуются хорошей урожайностью, устойчивостью к стрессам, более крупными цветочными головками и достаточным количеством эфирного масла [160].

По данным Lars - Gernot Otto и др., используя метод ручного опыления, были скрещены диплоидные и тетраплоидные сорта ромашки аптечной и получены новые сорта: Argenmilla (Аргентина), Bodegold (Германия 1966,

1977), Bohemia, Pohorelicky, Velkokvety (Чехия), Camoflora, Robumille Typ D (Германия), Margaritar (Румыния) [161].

Также с 1917 года выведением новых сортов ромашки аптечной занимались и в Белорусской зональной опытной станции. Наилучшим сортом для культивирования в те годы являлась «Эзельская», выпущенная Киевским акклиматизационным садом. Данный сорт отличался высоким качеством [162].

В Ивановской области А.С. Шуйский выделил из ромашки аптечной форму с прямостоящим кустом, что особенно удобно при механической сборке цветов.

На Украинской зональной опытной станции ВИЛР методом массового отбора были выведены два высокопродуктивных сорта ромашки аптечной «Азулена» и «Сибирская бизаболольная» [154, s. 83-91]. Так же на этой станции методом полиплоидии был выведен перспективный тетраплоидный сорт «Подмосковная». Данный сорт отличается высоким содержанием эфирного масла [163].

В Московской области был выведен диплоидный сорт «Айболит», у которого накопление эфирного масла достигает 0,57%, фенольных соединений до 0,29%,  $\alpha$ -бизаболола в составе эфирного масла – до 3%. В Ставропольском крае (Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр, Россия) выведен сорт ромашки «Машенька», у которого содержание эфирного масла – 1,21%, хамазулена 8-14%. Данный сорт характеризуется засухоустойчивостью, устойчивостью к болезням и вредителям (авторы: Чумакова Вера Владимировна, Чумаков Валерий Федорович, Коновалов Дмитрий Алексеевич). В Москве (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Россия) выведен диплоидный сорт «Настенька» с содержанием эфирного масла – 0,8%, хамазулена – 6,5% (авторы: Быкова Ольга Алексеевна, Дмитрачкова Наталия Семеновна, Тропина Нина Сергеевна, Тхаганов Руслан Рамазанович, Саматадзе Татьяна Егоровна, Осипов Владимир Ионович, Кадацкая Татьяна Геннадьевна). Также был выведен тетраплоидный сорт «Рассвет» с содержанием эфирного масла - 0,84%, хамазулена в эфирном масле - 9,0%, альфа-бизаболола - 4% (авторы: Тоцкая Светлана Анатольевна, Грязнов Михаил Юрьевич, Бурова Алла Евгеньевна, Антонова Елена Дмитриевна) [164].

### **1.11 Криоконсервация растительного материала**

Создание системы хранения семенного материала является важной задачей интродукции лекарственных растений и их промышленного культивирования. Современным направлением по сохранению семян дикорастущих лекарственных растений и интродуцентов является криогенное хранение в жидком азоте (криоконсервация) при сверхкритических низких температурах (-196°C) [165].

Криоконсервация применяется для хранения клеток, тканей, органов, семян и других биологических материалов. При таких низких температурах, метаболические процессы замедляются до минимума, что позволяет сохранить

их в неизменном состоянии на длительное время. Однако достижение низких температур без потери жизнеспособности остается достаточно непростой задачей [166, 167].

В настоящее время криоконсервация является наиболее инновационным и доступным биотехнологическим методом, который позволяет безопасно сохранять биоразнообразие животного и растительного мира в долгосрочной перспективе без риска генетических модификаций. Также, например, из замороженных семян в случае необходимости можно регенерировать целый организм. Кроме того, хранение коллекций в жидком азоте предотвращает риск поражения различными инфекциями, а также гибель от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды [166, р. 5-510; 167, с. 6-610].

Основоположником и пионером в области криоконсервации растений является профессор Акира Сакаи, который сообщил о выживаемости веточек шелковицы после хранения в жидком азоте [168].

Консервирование является важным звеном в решении ряда важнейших медицинских, экологических и хозяйственных проблем.

На сегодняшний день с помощью метода криоконсервации хранятся более 10 000 образцов растений и более 80% из них относятся к пяти культурам: картофелю, маниоке (кассава), бананам, шелковице и чесноку. Также с помощью данного метода хранятся тысячи образцов яблони и груши [169, 170].

Глубокая гипотермия (0÷4°C) обеспечивает более длительное хранение клеток, чем умеренная. Но такое хранение все же не способно исключить протекание процессов, приводящих к гибели клеток.

В мировой практике семена многих видов растений хранятся методом криоконсервации. Так, уже сформированы криобанки для семян кормовых растений, зерновых, овощных, некоторых плодовых культур, редких и исчезающих видов растений. По лекарственным же растениям научные сведения о криоконсервации являются редкими. Данное направление является весьма актуальной.

Криоконсервация, как биотехнологический метод хранения семян включает в себя несколько этапов: подготовка биологического объекта, в случае необходимости добавление растворов криопротекторных растворов, криозамораживание, хранение в жидком азоте, оттаивание, отмывка криопротектора, посев семян [167, с. 6-610].

При глубоком замораживании важно не допустить образования кристаллов льда, которые могут повреждать мембраны клеток. Это достигается путем комбинирования процессов замораживания – оттаивания, использования криопротекторов [167, с. 6-610; 168, р. 2744-1-2744-4; 170, р. 299-307].

При криоконсервации биологических объектов применяют несколько подходов или методик: метод медленного программного замораживания и методы, основанные на витрификации [171].

Так, методом витрификации были криоконсервированы семена *Bletilla striata* из семейства Орхидных, произрастающих в Ботаническом саду г. Тояма,

Япония. Семена помещались в криопробирки объемом 2,0 мл, содержащие 1,5 мл криозащитного раствора (2 М глицерина и 0,4 М сахарозы в среде New Dogashima). В криозащитном растворе семена находились в течение 15 мин при 25°C. Затем раствор удалялся и семена подвергались обезвоживанию при температуре 0°C в течение 2 ч с добавлением раствора PVS2 (2,0 мл) [172], который содержал 30% глицерина, 15% этиленгликоля и 15% диметилсульфоксида + 0,4М сахарозы. Далее криопробирки с семенами погружались непосредственно в жидкий азот на 30 мин. Размораживались семена на водяной бане при температуре 38°C. После удаления раствора PVS2 в каждую пробирку для проращивания семян добавляли по 1 мл жидкой среды New Dogashima с 0,4 М сахарозой. Результаты исследования показали, что всхожесть семян *Bletilla striata* после данного метода криоконсервации не снизилась и была на уровне контрольных значений [173]. Также данным методом были криоконсервированы семена *Vanda coerulea*, *Doritis pulcherrima* (Орхидные) [174], семена представителей рода *Cymbidium* (*C. goeringii*, *C. macrorhizon*, *C. finlaysonianum*) [175], *Carica papaya* [176], *Ponerorchis graminifolia* [177].

*Инкапсуляция-витрификация* основывается на заключении образцов в альгинатные сферы. Данный процесс включает в себя как метод инкапсуляции, так и метод витрификации. Эксплантаты инкапсулируют в шарики альгината кальция, затем их культивируют на среде с сахарозой, дегидратируют в растворах PVS1, PVS2, PVS3. Удалось успешно применить данный метод для 22 родов растений [178].

*Инкапсуляция-дегидратация* также основывается на заключении объектов в альгинатные сферы для увеличения устойчивости к потере влаги. Данный метод был применен для *Oncidium bifolium*. [179], семян *Cyrtopodium Hatschbachii* (Orchidaceae) [180], *Paphiopedilum exul* (Orchidaceae), [181], зародыши *Lilium ledebourii* (Liliaceae) [182], *Medicago rigidula* (Fabaceae) [183].

### **1.12 Использование криопротекторов при криоконсервации**

Криопротекторы – это химические вещества, предотвращающие живые объекты от повреждений, вызванных замерзанием внутриклеточной воды при действии низких температур. Механизм действия криопротекторов остается до конца неизученной. Как известно, вода расширяется при замерзании, но вопреки распространенному мнению, не только расширение воды приводит к повреждениям. Вода является растворителем и содержит в своем составе множество различных химических элементов. При замерзании она кристаллизуется как чистая вода, можно сказать очищается и выталкивает примеси наружу, тем самым повреждая клетку [184].

Сверхнизкая температура вызывает повреждения биологических тканей двумя различными механизмами - механическое повреждение и осмотический стресс. В таких областях повышается осмотическое давление из-за содержания высоких концентраций химических веществ в остаточной воде, что ведет к повреждениям клеток. И для того, чтобы исключить или предотвратить

вышеуказанные повреждения при криоконсервации используются криопротекторы, которые растворяются в воде и снижают риск возникновения травм [185].

Растущий лед в межклеточном пространстве уплотняет клетки в свободные и уменьшающиеся пространства с незамерзшей жидкостью по мере понижения температуры. Клетки сжимаются между кристаллами льда и подвергаются воздействию смертельных концентраций соли, что приводит к обезвоживанию. Криопротекторы способствуют поддержанию исходных размеров таких межклеточных пространств при понижении температуры, тем самым предотвращают клетку от механического и осмотического повреждения [184; 185, р. 209-222].

Криопротекторы растворимы в воде, они эффективно снижают температуру плавления воды, не выпадают в осадок и относительно нетоксичны для клеток при высокой концентрации. Все криопротекторы образуют водородные связи с водой.

В 1984 году криобиолог Грегори Фахи предложил метод витрификации при криоконсервации биологических объектов. Витрификация – это метод превращение в стеклообразное состояние межклеточной и внутриклеточной воды. Грегори Фахи предложил способ превращения всего объема ткани или органа в стекловидное состояние, также той области межклеточного пространства, в которой вода не успела кристаллизоваться. Для достижения витрификации было предложено перед охлаждением ввести в ткань или орган такое количество криопротектора, которая помогла бы избежать образования льда в течение всего процесса замораживания. Так, при температуре примерно -100°C, оставшаяся некристаллизованная жидкость затвердевает в виде стекла, что позволяет хранить биологические объекты практически неограниченное количество времени. Клетки выживают при замораживании, находясь внутри стекловидного тела между кристаллами льда [186].

Часто применяемые криопротекторы относятся к типу, так называемых проникающих крипротекторов. К ним относятся глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль и диметилсульфоксид. Как известно такие крипротекторы состоят из небольших молекул, способные легко проникать в клетки через мембраны. Проникая в клетки, они сохраняют ее от чрезмерной дегидратации в процессе замораживания. Непроницающие криопротекторы представляют собой относительно крупные молекулы, обычно полимеры. Они подавляют рост внутриклеточного льда по тому же механизму, что и проникающие криопротекторы, но не способны проникать внутрь клетки. К непроницающим криопротекторам относятся полиэтиленгликоль (ПЭГ) и поливинилпирролидон (ПВП), а также сахара. Такие криопротекторы обычно менее токсичны, чем проникающие при тех же концентрациях [184; 186, р. 407-425; 187].

Далее приведены виды и характеристики некоторых криопротекторов:

*Спирт метиловый* применяется в качестве криозащитного агента при криоконсервации растительного материала. Является токсичным при окислении до формальдегида.

*Этиловый спирт* (м.м. 46) является менее токсичным, чем метиловый спирт. Природа его токсичности подобна природе токсичности метилового спирта. Окисление этилового спирта приводит к образованию ацетальдегида.

*Этиленгликоль* (м.м. 62) используется при криоконсервации различных биологических объектов животного и растительного происхождения. Токсичность этиленгликоля на организменном уровне, связывают с окислением до альдегида. Рекомендуются его удаление из биологического объекта сразу же после криоконсервации.

*Пропиленгликоль (1,2-пропандиол)* (м.м. 76) бесцветная вязкая жидкость, не имеет запаха, обладает сладковатым вкусом. Является двухатомным спиртом алифатического ряда. Широко применяется в качестве криопротектора при замораживании эритроцитов человека.

*Глицерин* (м.м. 92,09) трёхатомный спирт, вязкая, прозрачная, гигроскопичная жидкость. Хорошо смешивается с водой в любых пропорциях. Широко используется при криоконсервации объектов как животного происхождения, так и растительного. Обладает малой токсичностью.

*Диметилсульфоксид (ДМСО)* (м.м. 78,13) органическое вещество, бесцветная жидкость без запаха. Используется как криопротектор при криоконсервации животного материала и растительного. Однако является чрезмерно токсичным при распаде, особенно при хранении в теплом помещении.

*Глюкоза и сахароза.* Органические соединения, сахара. Достаточно широко применяются в практике криоконсервирования в качестве криопротекторов и компонентов отмывающей среды. При консервировании растительных объектов используется для адаптации клеток к факторам криоконсервирования как дегидратирующие агенты (рисунок 6) [187, p. 154-158; 188].



Рисунок 6 – Виды криопротекторов

Некоторые широко используемые криопротекторы и дополнительные криозащитные растворы, используемые при криоконсервации биологических объектов, представлены на рисунке 7.

Название криопротекторов	
Ацетамид	Пиридин-N-оксид
Альбумин	Рибоза
Ацетат аммония	Серин
Хлорид магния	Хлорид натрия
Диэтиленгликоль	Бромид натрия
Диметиламид	Йодид натрия
Диметилсульфоксид	Сульфат натрия
Этанол	Сорбит
Эритрит	Сахароза
Этиленгликоль	Триэтиленгликоль
Глицерол	Триметиламин
Глюкоза	Ацетат
Формаид	Ксилоза
Глицерофосфат	Валин
Пролин	Рибоза

Рисунок 7 – Список криопротекторов

### 1.13 Токсичность криопротекторов

Некоторые криопротекторные вещества могут оказывать токсические действия в отношении биологических объектов. До конца не ясно, почему некоторые криопротекторы обладают токсическими свойствами. Однако существуют мнения, что они обладают сродством к липидам мембран, что позволяет им легко проникать и нарушать их стабильность. Однако это является предположением. Исследования зарубежных авторов также показали, что существует значительная связь с ионами водорода, которая может коррелировать с токсичностью, судя по всему, за счет разрушения гидратационной оболочки вокруг макромолекул. Некоторые авторы приводят результаты о том, что криопротекторы с полярными группами, которые слабо взаимодействуют с водой, лучше всего подходят для витрификации, даже если для достижения витрификации требуется более высокая концентрация [184; 188, р. 22-34]. Токсичность криопротекторов для мембран клеток также связывают с их электрическими свойствами [184; 189].

Как показывает опыт, использование криопротекторов с низкой концентрацией при криоконсервации биологических объектов позволяет избежать их токсического действия.

## 2 КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЯН

Семена подразделяют на ортодоксальные и рекальцитрантные. В ортодоксальных семенах, как правило, влажность составляет 5-12%. Низкая влажность позволяет хранить семена в течение длительного времени не теряя жизнеспособности. В литературе отмечено, что ортодоксальные семена наиболее пригодны для хранения при сверхнизких температурах [190]. В работе Никишиной и др. сообщается о криоконсервации семенного материала зерновых культур, ягод и декоративных культур (*Cymbidium mastersii* Griff. ex Lindl. и *Dendrobium crumenatum* Swartz). Авторы применяли многократное замораживание семян. Результаты показали, что сверхнизкая температура не оказала отрицательного влияния на жизнеспособность семян, вышеуказанных видов растений [191].

А.Б. Холиной и Н.М. Воронковой была проведена работа по криоконсервации семян дикорастущих лекарственных культур, произрастающих на Дальнем Востоке России. Объектами исследования являлись семена растений из семейства бобовых (*Astragalus membranaceus*, *Hedysarum austro-kurilense*, *H.sahalinense*, *Oxytropis chankaensis*, *O. kamtschatica*, *O. ochotensis*, *O. revoluta-1*, *O. revoluta-2*, *O. retusa*, *Sophora flavescens*, *Trifolium lupinaster*, *Vicia amurensis*), также гравилат крупнолистный (*Rosaceae*), рубус приземистый (*Rosaceae*), патриния сибирская (*Valerianaceae*), патриния скабиозолистная (*Valerianaceae*), смородина печальная (Крыжовниковые), очитник трехлистный (*Crassulaceae*), красника (*Ericaceae*). Свежесобранные семена были заложены в жидкий азот на 1 месяц, в качестве тары была использована фольга. Авторы утверждают, что лабораторная всхожесть криоконсервированных семян была высокой, а у некоторых видов даже выше контрольных показателей [192].

Семена рекальцитратные очень чувствительны к потере влаги, что приводит к их гибели. Рекальцитрантные семена характеризуются повышенным содержанием влаги. В связи с этим, для нормального роста и развития таких семян, не желательно понижать влажность ниже 15-25 процентов. К рекальцитратным относятся в основном семена деревьев (*Quercus*, *Castanea*, *Corylus*, *Citrinae*) и многих растений, произрастающих в тропическом климате. Такие семена хорошо сохраняются в условиях с повышенным содержанием влаги и с высокой температурой. Но для таких семян характерна низкая жизнеспособность. Такие семена имеют большие размеры, что является проблемой при их высушивании и хранении в жидком азоте. Поэтому перед хранением таких семян в сосудах Дюара рекомендуется изолировать зародыш или ее ось, для их обезвоживания. Обезвоживание зародышей позволяет исключить образование крупных кристаллов льда при криоконсервации. Так, в работе авторов Oliveira и др. даны результаты замораживания зародышей семян *Attalea vitrivir*. Это тропическая пальма, произрастающая в центральной части Бразилии. Является ценнейшей древесной культурой в народном хозяйстве. Семена *Attalea vitrivir* хранились в течение года на открытом воздухе под

солнцем, в тени, в холодильнике, в морозильной камере, а зародыши в жидком азоте в сосудах Дюара. Исследования авторов показали, что выше перечисленные методы позволяют хорошо сохранить всхожесть данной культуры. Стоит также отметить, что авторы рекомендуют использовать метод криоконсервации при хранении зародышей *Attalea vitrivir* [193].

В таблице 5 даны результаты криоконсервации семенного материала различных культур.

Таблица 5 - Криоконсервация семян различных видов растений

Название вида	Метод криоконсервации
1	2
<i>Satureja bachtiarica</i>	Витрификация с PVS2, глицерин
<i>Aquilegia fl abellata</i> Siebold et Zucc.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Arabis stelleri</i> DC	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Cardaminopsis petraea</i> (L.) Hiit.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Erysimum pallasii</i> (Pursh) Fern.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Hedysarum sachalinense</i> B. Fedtsch.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Hemerocallis esculenta</i> Koidz.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Patrinia sibirica</i> (L.) Juss.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Picris japonica</i> Thunb.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Plantago camtschatica</i> Link	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Potentilla egedii</i> Wormsk.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Potentilla nivea</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Potentilla stolonifera</i> Lhm. ex Ledeb.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Rubus chamaemorus</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Saxifraga cherlerioides</i> D. Don.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Tephrosia kawakamii</i> (Makino) Holub	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Trollius riederianus</i> Fisch. et C. A. Mey.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Aquilegia fl abellata</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Arabis glauca</i> Boissieu	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Hemerocallis esculenta</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Honckenya oblongifolia</i> Torr. et Gray	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Pedicularis schistostegia</i> Vved.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Picris japonica</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Rhodiola sachalinensis</i> Boriss.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Vaccinium praestans</i> Lamb.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Veratrum grandiflorum</i> (Maxim. ex Baker) Loes. fl.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Veronica schmidtiana</i> Regel	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Arnica unalaschcensis</i> Less.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Cardaminopsis lyrata</i> (L.) Hiit.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Montia fontana</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Milium effusum</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Pedicularis oederi</i> Vahl	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Pedicularis schistostegia</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Plantago camtschatica</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Potentilla fragiformis</i> subsp. <i>megalantha</i> (Takeda) Hult	Прямое погружение в жидкий азот

Продолжение таблицы 5

1	2
<i>Viola sachalinensis</i> Boissieu	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Viola selkirkii</i> Pursh ex Goldie	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Digitalis purpurea</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Iris pseudacorus</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Phalacrolooma annuum</i> (L.) Dummort.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Cardamine regeliana</i> Miq.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Cochlearia officinalis</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Stenotheca tristis</i> (Willd. ex Spreng.) Schljakov	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Cardamine regeliana</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Papaver mtyabeanum</i> Tatew.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Empetrum sibiricum</i> V. Vassil.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Potentilla fragiformis</i> subsp. <i>megalantha</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Coptis trifolia</i> (L.) Salisb.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Luzula capitata</i> (Miq.) Kom.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Primula cuneifolia</i> Ledeb.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Anemonastrum sachalinensis</i> (Juz) Starodub.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Hedysarum ustrokurilense</i> (N. S. Pavlova)	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Lathyrus japonicus</i> Willd.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Angelica ursina</i> (Rupr.) Maxim.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Myosotis sachalinensis</i> M. Pop.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Rhododendron aureum</i> Georgi	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Arnica unalaschcensis</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Scrophularia grayana</i> Maxim. et Kom.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Veronica americana</i> (Raf.) Schwein ex Benth.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Oxytropis retusa</i> Matsum.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Fragaria yezoensis</i> Hara	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Draba hyperborean</i> (L.) Desv.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Tanacetum ulutavicum</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Verbascum phlomoides</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Calendula officinalis</i> L.	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Achillea ledebourii</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Verbascum officinalis</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Picea asperata</i>	Заморозка ступенчатая
<i>Picea pungens</i> Engelm.	Заморозка ступенчатая
<i>Nepeta cataria</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Nepeta pannonica</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Linum usitatissimum</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Citrus sinensis</i>	Прямое погружение в жидкий азот с предварительной сушкой
<i>Citrus paradise</i>	Прямое погружение в жидкий азот с предварительной сушкой

Продолжение таблицы 5

1	2
<i>Citrus reticulata</i>	Прямое погружение в жидкий азот с предварительной сушкой
<i>Xerophyllum asphodeloides (L.) Nutt.</i>	Прямое погружение в жидкий азот
<i>Scabiosa ochroleuca</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Scabiosa isetensis</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Calendula officinalis</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Linum usitatissimum</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Valeriana officinalis</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Echinacea pallida</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Echinacea purpurea</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Silybum marianum</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Lychnis chalcedonica</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Salvia stepposa</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Thymus serpyllum</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Portulaca oleracea</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
<i>Nepeta cataria</i>	Прямое погружение в жидкий азот, криопротекторы
Примечание – Составлено по источникам [190, с. 75-81; 194-206]	

## 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования были взяты семена *Ch. recutita* таких сортов, как «Старый лекарь», «Подмосковная», «Айболит» и «Карагандинская». Семена сорта «Карагандинская» были приобретены в питомнике Международного научно-производственного холдинга «Фитохимия». Семенной материал оставшихся трех сортов были приобретены по делектусу в РГП на ПХВ «Алтайский ботанический сад».

### 3.2 Методы исследования

Для определения особенностей внешних признаков семенного материала сортов *Ch. recutita* было проведено их морфологическое изучение в лабораторных условиях на микроскопе фирмы МБС1. Фотографии выполняли на макроскопе Levenhuk.

Вес образцов семян оценивали путем взвешивания в 5-кратной повторности по 50 штук на аналитических весах Shimadzu AY220, пересчитывая на 1000 штук (рисунок 8).



Рисунок 8 – Определение весовых показателей семян *Chamomilla recutita* четырех сортов

Одним из главных критериев успешного криохранения является определение влажности семян, которую определяли на влагометре фирмы Ohaus (рисунок 9).



а



б

Рисунок 9 – Определение влажности семян *Chamomilla recutita* на влагомере Ohaus

### 3.3 Метод криоконсервации семенного материала

Работы по оптимизации методов криоконсервации семян *Ch. recutita* в жидком азоте проводились с 2018 по 2021 гг. Семена заранее высушивались, упаковывались в бумажные пакеты и хранились в холодильной камере. Часть семян была отобрана для криоконсервирования в жидком азоте.

Для организации системы длительного хранения в жидком азоте были осуществлены опыты по оптимизации условий криоконсервации. Криогенное хранение семенного материала *Ch. recutita* проводили путем прямого погружения пластиковых криопробирок объемом 5,0 мл фирмы GMB Genmax Biotech в сосуд Дюара СДС 20 Криомаш (рисунок 10).



а



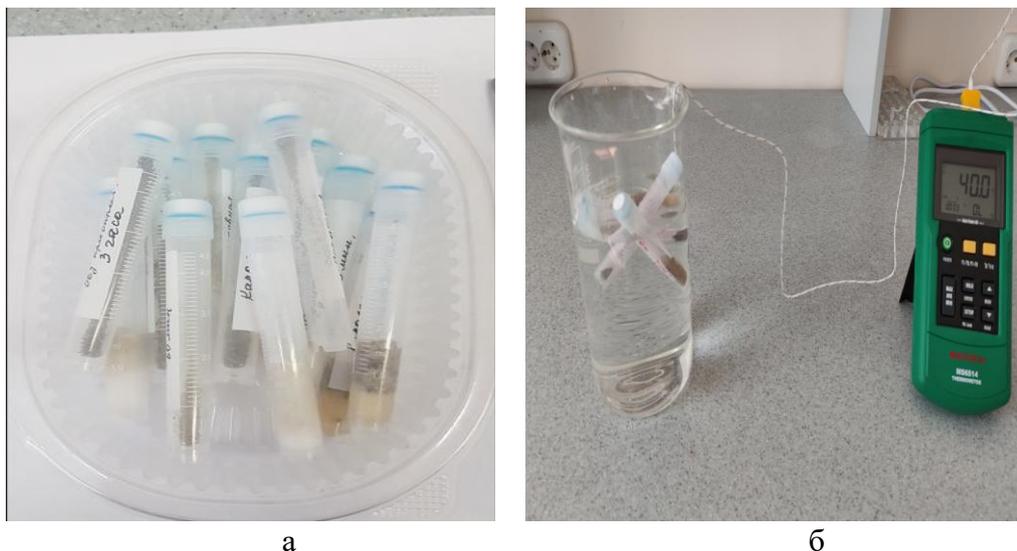
б



в

Рисунок 10 – Процесс криогенного хранения семян *Chamomilla recutita*

После криогенного хранения в жидком азоте семена размораживали, используя два режима – это медленное размораживание (при комнатной температуре 20-22°C) и быстрое размораживание (на водяной бане при +40°C) (рисунок 11). При разморозке семян на водяной бане температуру воды определяли термомпаром фирмы Mastech (MS6514).



а – медленное размораживание; б – быстрое размораживание

Рисунок 11 – Оптимизация условий размораживания семян *Chamomilla recutita* после криоконсервации

С целью повышения жизнеспособности семян *Ch. recutita* при криоконсервации нами были использованы общеизвестные криопротекторные вещества и растворы. Были применены проникающие и непроникающие криопротекторы в различных концентрациях.

*Проникающие криопротекторы:*

1. ДМСО – 5, 10, 15%.
2. Пропиленгликоль – 5, 10, 15, 20%.

*Непроникающие криопротекторы:*

1. Сахароза – 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40%.
2. Глюкоза – 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40%.
3. Фруктоза – 5, 10, 15, 20, 25, 30%.

Также был использован криопротекторный раствор PVS2 (30% глицерин, 15% этиленгликоль, 15% ДМСО и 0,4М сахароза).

Выбор данных криопротектор обусловлен эффективностью их использования при криоконсервации растительных объектов [206, 207, 208].

Для оценки эффективности криоконсервации определяли жизнеспособность семян *Ch. recutita* по лабораторной всхожести и энергии прорастания, согласно методическим рекомендациям Зориной М.С., Кабановой С.П., а также рекомендациям Cooperland L.O. и др. [209, 210]. После размораживания семена промывали от криопротекторных растворов дистиллированной водой и ставили на проращивание в чашки Петри диаметром 90 мм. Проращивали семена по 100 штук в четырехкратной повторности на двухслойной фильтровальной бумаге, предварительно смоченной также дистиллированной водой. Затем чашки Петри с семенным материалом ставили на дальнейшее проращивание в климатическую камеру Binder при температуре +24°C. Освещены в климатической камере было постоянным (рисунок 12). Во время наблюдения за проращением ежедневно вели подсчет появившихся

проростков. Всхожесть определяли на 15 сутки, энергию прорастания на 7 сутки. Контрольной группой служили семена без замораживания в жидком азоте, которые хранились традиционным методом в темном, прохладном месте.

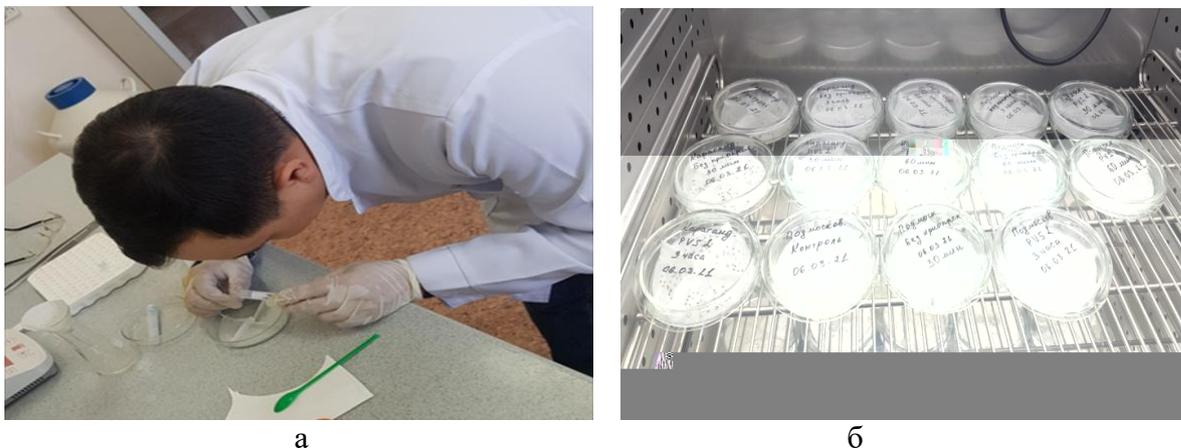


Рисунок 12 – Определение лабораторной всхожести и энергии прорастания семян *Chamomilla recutita* после криогенного хранения

### 3.4 Предпосевная обработка семян

Для повышения жизнеспособности семян *Ch. recutita* после криоконсервации была проведена предпосевная обработка физическими факторами активации. Применены методы барботирования и воздействия магнитного поля. При барботировании семенной материал сортов *Ch. recutita* помещался в пластиковую колбу с водой и насыщался кислородом, подаваемого из газового источника (рисунок 13а). Для изучения воздействия магнитных полей семенной материал *Ch. recutita* подвергался влиянию одинарного и двойного магнитного поля в течение суток и 3-х суток. Бумажные тары с семенами *Ch. recutita* располагались перед планкой с магнитами в область, где магнитные поля были однородными. Семена располагались на определенном расстоянии от планки – 12 см и 24 см, что соответствует напряженности магнитного поля 140 мкТл (двойное магнитное поле Земли) и 75 мкТл (одинарное магнитное поле Земли). Данные величины определялись суммарным магнитным полем пластины и Земли. Измерения магнитного поля осуществлялись магнитометром, встроенным в смартфон и приложением EMF Finder (рисунок 13б).



а



б

а – барботирование; б – магнитное поле

Рисунок 13 – Предпосевная обработка семян *Chamomilla recutita* после криогенного хранения в жидком азоте

### 3.5 Определение количественного накопления и компонентного состава эфирного масла

Для изучения количественного накопления эфирного масла в надземной части растений *Ch. recutita* использовали метод водной дистилляции (рисунок 14). Зрелое растение было выращено из семян, которые хранились в жидком азоте. Эфирное масло получали из измельченной подсушенной надземной массы растения (без грубых стеблей) на аппарате Клевенджера в течение 2-х часов с использованием гексана в качестве ловушки. Определение компонентного состава эфирных масел проводили на газовом хроматографе Clarus-SQ 8 с масс-спектрометрическим детектором. Условия хроматографии: колонка капиллярная RestekRxi®-1 ms 0,25 мм x 30м x 0,25 мкм; объем пробы: 1,0 мкл; газ-носитель He; скорость газа-носителя: 1 мл/мин; деление потока 1:25; t колонки: 45°C (2 мин), подъем 1,5°C/мин до 200°C, далее 15°C/мин до 280°C, изотермический режим при 280°C в течение 10 мин; t испарителя – 280°C, масс-спектрометрический детектор: t – 240°C, EI+ = 70 eV; время сканирования с 4 по 120 мин; режим сканирования ионов 39-500 m/z. Процентные содержания компонентов вычислялись автоматически, исходя из площадей пиков общей хроматограммы ионов. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, с использованием библиотеки NIST. Время удерживания компонентов пересчитывали относительно предельных углеводов.

Данная работа проводилась в Институте прикладной химии при Евразийском национальном университете имени Л.Н. Гумилева.



Рисунок 14 – Получение эфирного масла из надземной части *Chamomilla recutita* методом водной дистилляции

### **3.6 Изучение анатомического строения семян и проростков**

Анатомическое строение семян и проростков изучали методом давленных препаратов. Препараты изготавливали вручную. Готовые препараты семян и проростков просматривали при помощи микроскопа BioMed, фотоснимки производили при помощи фотокамеры смартфона, установленной на тубусе микроскопа, фотографии обрабатывали в фоторедакторе Paint 10.0. Описание анатомических особенностей строения различных частей проростков *Ch. recutita* проводили согласно методам Л.И. Лотовой [211].

### **3.7 Изучение ультраструктуры поверхности семян**

Образцы семян сортов *Ch. recutita* исследовали на сканирующем электронном микроскопе Tescan MIRA-3 с катодом Шоттки, на базе межфакультетской лаборатории электронной микроскопии НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова». Семенной материал высушивался до 2,5-3% влажности, поверхность перед съемкой напыляли золотом. Сканирование осуществляли при ускоряющем напряжении 3В. Съемка производилась при одинаковых полях обзора, при разном увеличении: от 73х до 5,05 кх. Описание ультраструктуры поверхности семенного материала производился в соответствии с рекомендациями E. Cervantes (2016), D.G. Gabr (2018), J.-H. Song (2018) и др. [212-218].

### **3.8 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку и графическую визуализацию полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и в среде RStudio. При обработке данных высчитывали средние арифметические показатели, стандартные отклонения, статистически значимые различия средних показателей данных определяли при помощи однофакторного дисперсионного анализа по критерию Тьюки (Tukey's HSD test).



Сравнительный анализ внешних параметров семян показал, что есть некоторые различия по цвету. Так семена сорта «Карагандинская» характеризуются светло-коричневым цветом, в то время как остальные сорта варьируются от буровато-зеленого (Подмосковная) до светло-зеленого (Айболит и Старый лекарь).

Форма семян: сорт "Карагандинская" имеет округлую, бочонковидную форму семян с легкой изогнутостью, что отличает её от других сортов, которые имеют продолговатую и изогнутую форму.

У «Подмосковной» верхушка косо усеченная, а у сортов «Айболит» и «Старый лекарь» семянки сужены у основания. Поверхность семянки сорта «Карагандинская» имеет незначительную ребристость на дорзальной стороне. Семена остальных сортов отличаются гладкой дорзальной стороной, а на вентральной стороне присутствуют продольные ребрышки. По размерам семян сорт «Карагандинская» отличается более крупными размерами, так длина семян составляет 1,79 мм, а ширина 0,74 мм. Самые мелкие семена у сорта «Айболит». Длина семени 1,05 мм, ширина 0,38 мм (таблица 6).

Таблица 6 – Некоторые морфометрические и весовые параметры семян сортов *Chamomilla recutita*

Признак	Сорт «Карагандинская»	Сорт «Подмосковная»	Сорт «Айболит»	Сорт «Старый лекарь»
Длина, мм				
Ширина, мм				
Вес 1000 семян, г	±0,012	±0,006	±0,005	±0,003

Самый большой вес 1000 семян отмечается также у сорта «Карагандинская» - 0,62 г., а наиболее низкий у сорта «Старый лекарь» - 0,078 г., хотя размеры семян данного сорта незначительно выше показателей сорта «Айболит». Это возможно связано с их внутренней низкой плотностью, структурой или низким содержанием влаги, несмотря на их относительно крупные размеры. Таким образом, все сорта различаются как по внешнему виду семян (цвет, форма), так и по их размерам и весу, особенно сорт «Карагандинская».

#### 4.2 Определение влажности и жизнеспособности свежесобранных семян сортов *Chamomilla recutita*

Для оценки качества и пригодности к хранению семян нами была определена влажность семенного материала всех четырех сортов *Ch. recutita*. Определение данного показателя позволяет прогнозировать сроки хранения семян, так как семена с высокой влажностью больше всего подвержены к гниению, плесневению и повреждению вредителями, что отрицательно сказывается при хранении. Также высокое содержание влаги в семенах влияет на способность их к прорастанию. Так, семена с высокой влажностью могут быстрее терять энергию прорастания, а с очень низкой - затруднять процесс

прорастания. Следует также отметить, что перед закладкой на хранение некоторые семена подвергаются сушке, если концентрация влаги в них повышена. Но здесь стоит соблюдать нормы высушивания семян, ведь пересушенные семена в последующем могут терять свою жизнеспособность.

Исходя из выше изложенного нами были проделаны работы по определению влажности семенного материала *Ch. recutita* сортов «Карагандинская», «Айболит», «Подмосковная» и «Старый лекарь». Определение содержания влаги в семенах проводилось на влагометре фирмы Ohaus. Свежесобранные семена хранились в сухом, прохладном, темном месте. Для работы семена специально не отбирались и не отбраковывались.

В результате исследования были получены следующие результаты (таблица 7). Наибольшее содержание влаги было определено в сорте «Карагандинская» и составило 5,5%. Наименьшие показатели влажности отмечены в сортах «Подмосковная» и «Старый лекарь» и составили 5,2%. В сорте «Айболит» содержание влаги составило 5,3%.

Таблица 7 – Определение влажности семян сортов *Chamomilla recutita*

Название сорта	Вариант опыта	Влажность семян, %
Сорт Карагандинская	Контроль	5,5
Сорт Айболит	Контроль	5,3
Сорт Подмосковная	Контроль	5,2
Сорт Старый лекарь	Контроль	5,2

Таким образом, можно предположить, что семена исследуемых сортов имеют хорошие шансы на успешное криоконсервирование, так как одним из важных условий эффективного криоконсервирования является низкое содержание влаги в замораживаемых биологических объектах. В нашем исследовании семена сортов *Ch. recutita* показали влажность в диапазоне от 5,2 до 5,5%, что находится в пределах нормальных значений для ортодоксальных семян, у которых высокая устойчивость к низким температурам.

Также нами было проведено определение контрольной всхожести семян 4-х сортов *Ch. recutita* для оценки способности семян прорасти в лабораторных условиях и для определения качества партии полученных семян. Для определения контрольной всхожести семян 4-х сортов *Ch. recutita* семенной материал ставили на проращивание в чашках Петри по 100 шт. в 4-кратной повторности на двухслойной фильтровальной бумаге, предварительно смоченной дистиллированной водой. Чашки Петри с семенным материалом помещали в климатическую камеру Binder при температуре +24°C с постоянным освещением, т.е. проращивали в контролируемых условиях. Во время наблюдения за прорастанием ежедневно отмечали появление проростков, всхожесть оценивали на 15 сутки, энергию прорастания на 7 сутки (таблица 8).

Таблица 8 – Определение контрольной лабораторной всхожести семян *Chamomilla recutita*

Сортовое название	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
«Карагандинская»	90,0±1,5	90,0±1,5
«Айболит»	70,0±1,5	71,0±1,7
«Подмосковная»	60,7±2,9	64,5±2,5
«Старый лекарь»	40,0±3,6	44,0±3,0

Результаты исследования показали, что максимальная контрольная всхожесть и энергия прорастания семян была получена у сорта «Карагандинская» и составили 90 и 90% соответственно. Минимальные показатели по всхожести и энергии прорастания семян были зафиксированы у сорта «Старый лекарь». Всхожесть данного сорта составила 44%, энергия прорастания 40%. У сортов «Айболит» и «Подмосковная» значения всхожести и энергии прорастания были средними. Так сорт «Айболит» показал всхожесть на уровне 71%, а энергию прорастания 70%. У сорта же «Подмосковная» контрольная всхожесть показала 64,5%, а энергия прорастания 60,7%. Таким образом, наиболее качественные показатели жизнеспособности были получены у сорта «Карагандинская». Приемлемые результаты по всхожести показали сорта «Айболит» и «Подмосковная». Стоит отметить, что у трех семян вышеперечисленных сортов очень хорошая скорость прорастания (дружность всходов) на начальном этапе посева, о чем свидетельствуют показатели энергии прорастания. Низкая жизнеспособность семян была выявлена у сорта «Старый лекарь». Данные показатели этого сорта могут быть связаны с тем, что семена не прошли полный цикл дозревания. Часто свежесобранные семена имеют низкую всхожесть и требуют дополнительного времени для окончательного созревания.

#### 4.3 Всхожесть семян сортов *Chamomilla recutita* в зависимости от сроков хранения

Перед нами стояла задача определить всхожесть семян всех 4-х сортов *Ch. recutita*, хранившихся в нашей лаборатории в течение трех лет традиционным методом, т.е. в сухом прохладном месте. Известно, что срок хранения семян играет важную роль в их жизнеспособности и способности к прорастанию. С течением времени многие семена теряют свою жизнеспособность, даже если хранятся при идеальных условиях. Этот процесс естественен и зависит от типа семян, влажности и температуры хранения. Ортодоксальные семена могут сохранять всхожесть многие годы, тогда как рекальцитрантные семена теряют её быстрее [210, р. 153-179].

Результаты исследования показали, что у свежесобранных семян сорта «Карагандинская» всхожесть составила 70%, после 1 года хранения всхожесть осталось практически неизменной и составила 71%, после двух лет хранения наблюдается увеличение всхожести на 10 процентов (всхожесть - 81%) и на

третий год хранения мы видим незначительное понижение всхожести – 78% (рисунок 16).

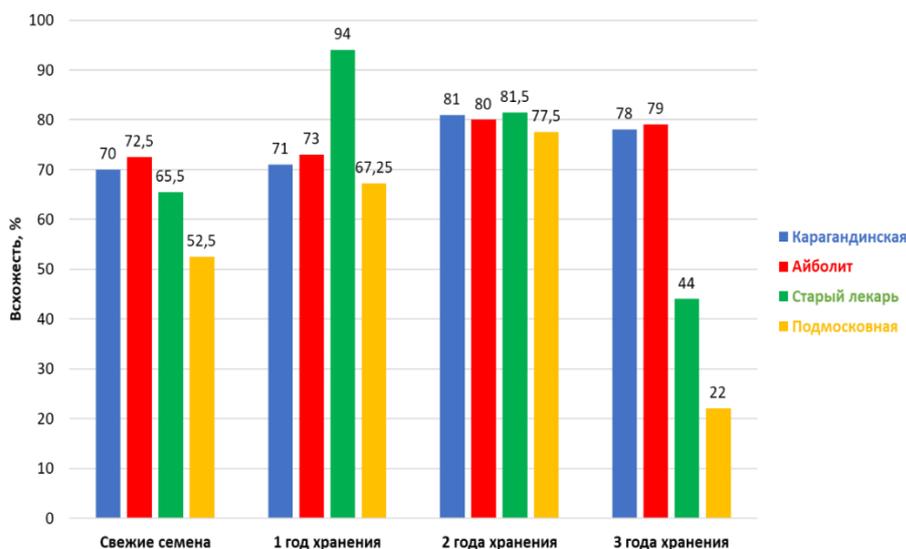


Рисунок 16 – Жизнеспособность семян сортов *Chamomilla recutita* в зависимости от сроков хранения

Свежесобранные семена сорта «Айболит» показали хорошую всхожесть на уровне 72,5%, после 1 года хранения мы видим, что показатели всхожести не изменились и составили 73%. На 2-й год хранения всхожесть повышается до 80% и на 3-й год хранения остается практически неизменной и составляет 79%.

В сорте «Старый лекарь» всхожесть свежесобранных семян составила 65,5%, далее после года хранения идет резкое увеличение всхожести до 94%. На 2-й год хранения всхожесть снижается до 81,5% и на 3-ий год хранения всхожесть резко падает почти в 2 раза и составляет 44%.

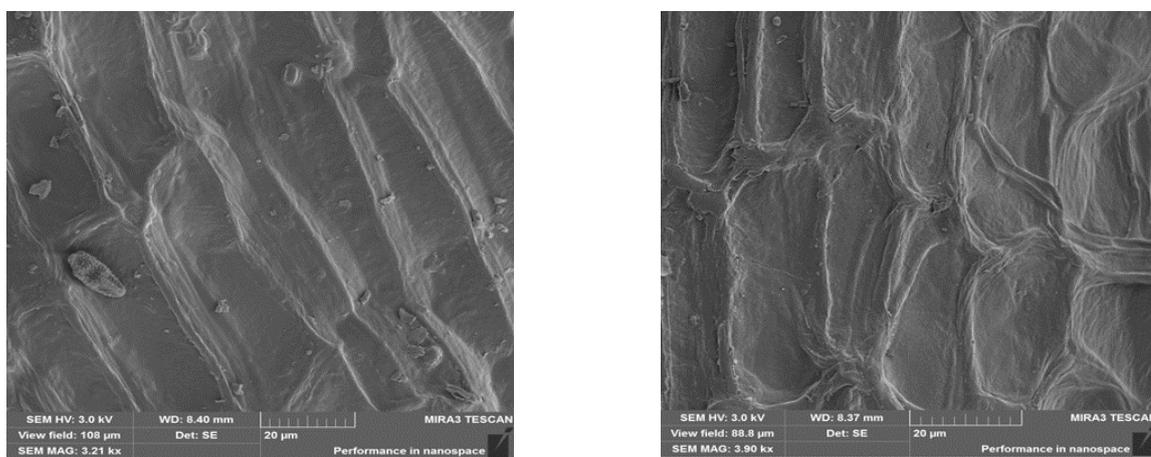
Всхожесть свежесобранных семян сорта «Подмосковная» оказалась самой низкой по сравнению с предыдущими сортами и составила 52,5%. Далее идет постепенное увеличение всхожести после 1-го года хранения (67,2%) и на 2-й год хранения (77,5%). А на 3-й год хранения всхожесть семян данного сорта значительно снижается и составляет всего 22%.

Таким образом семена сортов «Карагандинская» и «Айболит» демонстрируют наибольшую стабильность всхожести. Это указывает на хорошие адаптивные способности семян данных сортов, сохраняющиеся в течение трёх лет. Сорт «Старый лекарь» проявляет высокую всхожесть после одного года хранения, но затем постепенно теряет свои характеристики. Сорт «Подмосковная» показывает хорошие результаты только в первые два года, после чего резко снижается всхожесть. Это свидетельствует о слабой стабильности сортов и их способности сохранять жизнеспособность. Срок хранения напрямую влияет на качество семян данных сортов и чем дольше они хранятся, тем выше вероятность снижения их всхожести. Также, стоит отметить, что семена сортов «Старый лекарь» и «Подмосковная» по-видимому требуют послеуборочного дозревания.

#### 4.4 Изучение влияния криозамораживания на структуру семенной кожуры сортов *Chamomilla recutita*

Нами была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) поверхности семян 4-х сортов *Ch. recutita* до и после криоконсервации для анализа их морфологического состояния и структурных изменений. Данный метод дает возможность оценить, как сверхнизкие температуры могут повлиять на поверхность семян, включая возможные повреждения или изменения в текстуре. СЭМ позволила получить детализированные изображения микроструктур, что особенно важно для исследования сохранности оболочки семян и их жизнеспособности после размораживания. Описание ультраструктуры поверхности семенного материала производился в соответствии с рекомендациями E. Cervantes et al. (2016), D.G. Gabr (2018), J.-H. Song et al. (2018), N.D. Hallam (1970), S. Ray et al. (2014), Z. Lubna et al. (2019), M. Vona (2020).

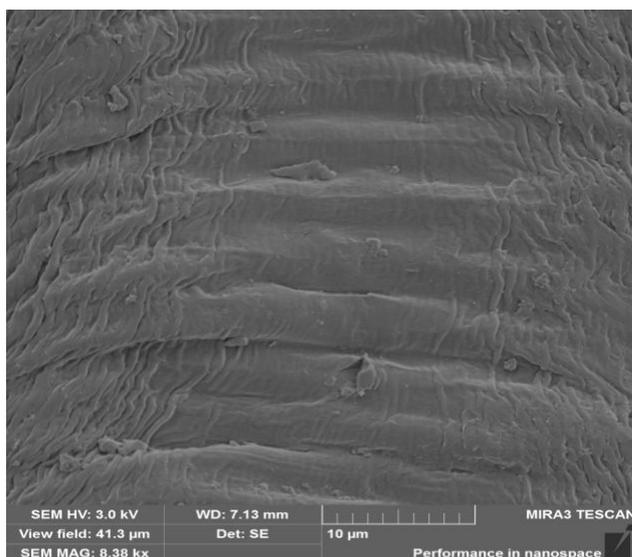
На поверхности семян *Ch. recutita* сорта «Карагандинская» до криозамораживания наблюдается выраженная сложная структура, орнамент структур сетчатый, расположение ячеек неправильное. Внутренняя поверхность ячеек гладкая, стенки узкие (тонкие). После криоконсервации структура семенной кожуры не меняется, наблюдается утолщение стенок ячеек, поверхность остается гладкой, трещины и какие-либо повреждения не наблюдаются (рисунок 17).



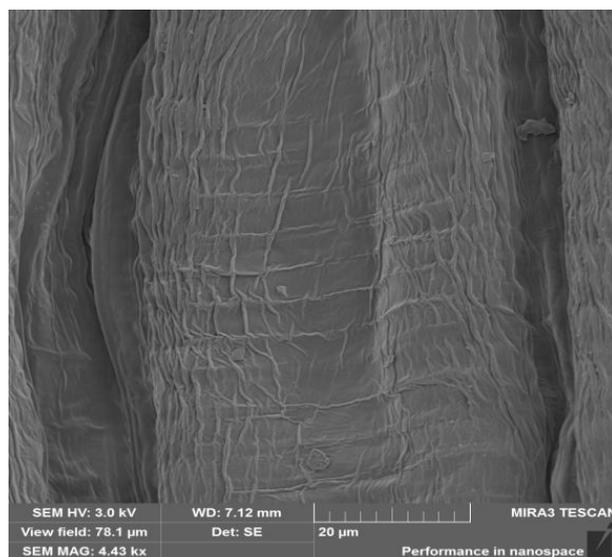
а – до криоконсервации; б – после криоконсервации

Рисунок 17 – СЭМ микроскопия поверхности семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская»

СЭМ микроскопия семян *Ch. recutita* сорта «Подмосковная» показала, что поверхность семян имеет ребристую структуру, поверхность гладкая, наблюдается тонкий восковой слой, иные структуры, включения не присутствуют. После криозамораживания структура семенной кожуры претерпевает незначительные изменения в виде углублений, идущие поперечно ребристой структуре. Восковой слой не нарушен, трещины не наблюдаются (рисунок 18).



а

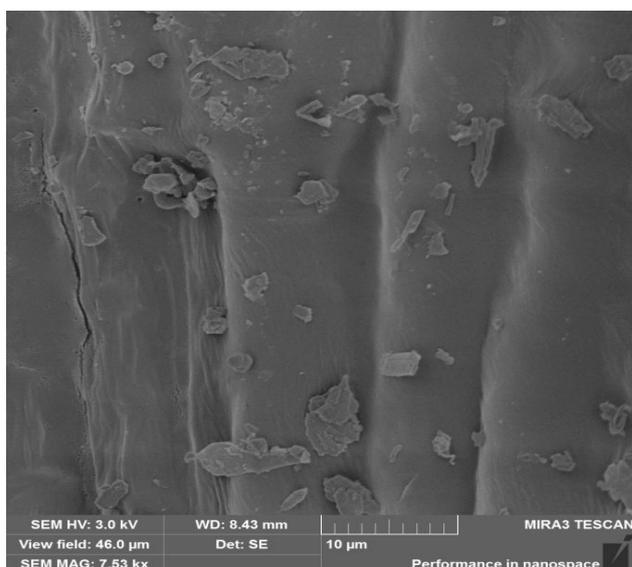


б

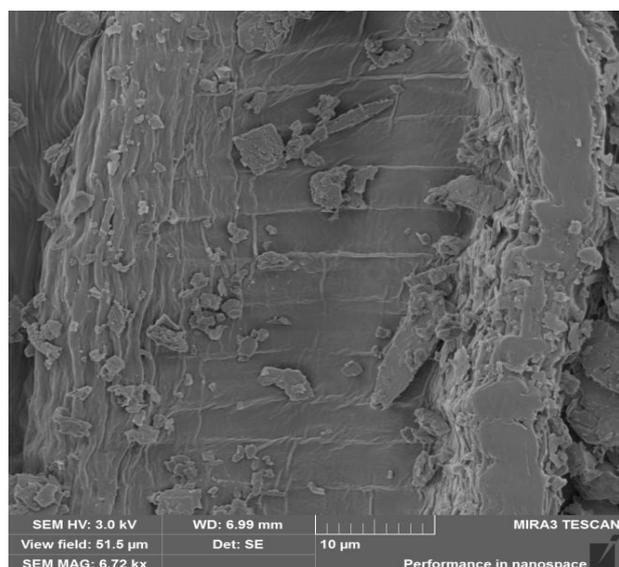
а – до криоконсервации; б – после криоконсервации

Рисунок 18 – СЭМ микроскопия поверхности семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная»

Поверхность семян *Ch. recutita* сорта «Айболит» имеет ребристую структуру, ребра лежат параллельно друг к другу, с гладкой поверхностью, наблюдаются углубления в виде бороздок, на поверхности наблюдаются частички воскового слоя. После криозамораживания структура семенной кожуры становится шероховатой, видны разрушенные частички воска, но сам эпидермис не нарушен, трещин и повреждений нет (рисунок 19).



а

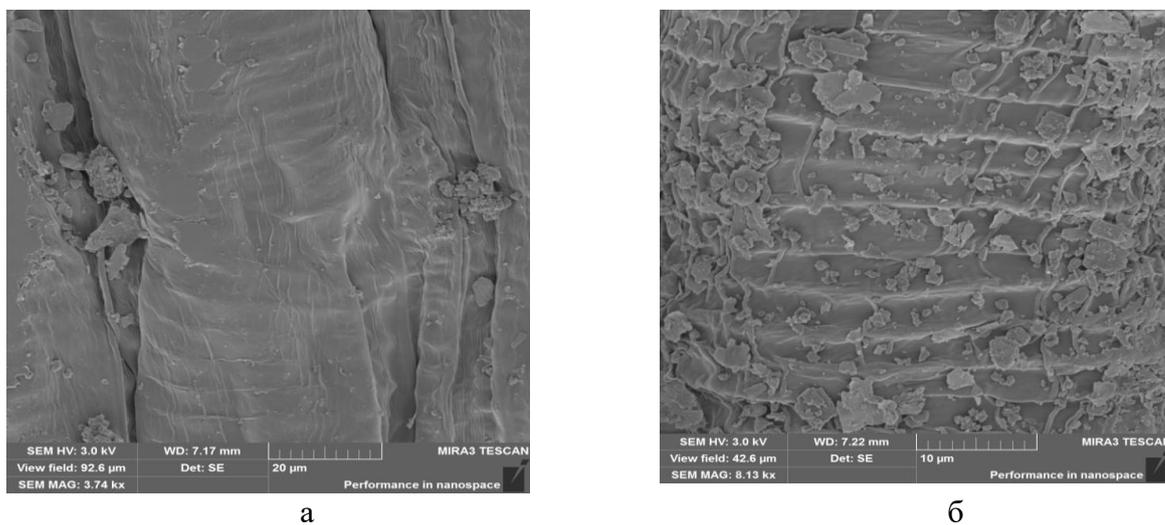


б

а – до криоконсервации; б – после криоконсервации

Рисунок 19 – СЭМ микроскопия поверхности семенного материала *Chamomilla recutita* сорта «Айболит»

Семена *Ch. recutita* сорта «Старый лекарь» также имеет ребристую структуру с гладкой поверхностью, стенки продольных ребер слабовыраженные, наблюдаются также углубления в виде бороздок, на поверхности наблюдаются частички воскового слоя. После криозамораживания структура семенной кожуры становится более выраженной, видны разрушенные частички воска, но эпидермис не нарушен, трещины и повреждения не выявлены (рисунок 20).



а – до криоконсервации; б – после криоконсервации

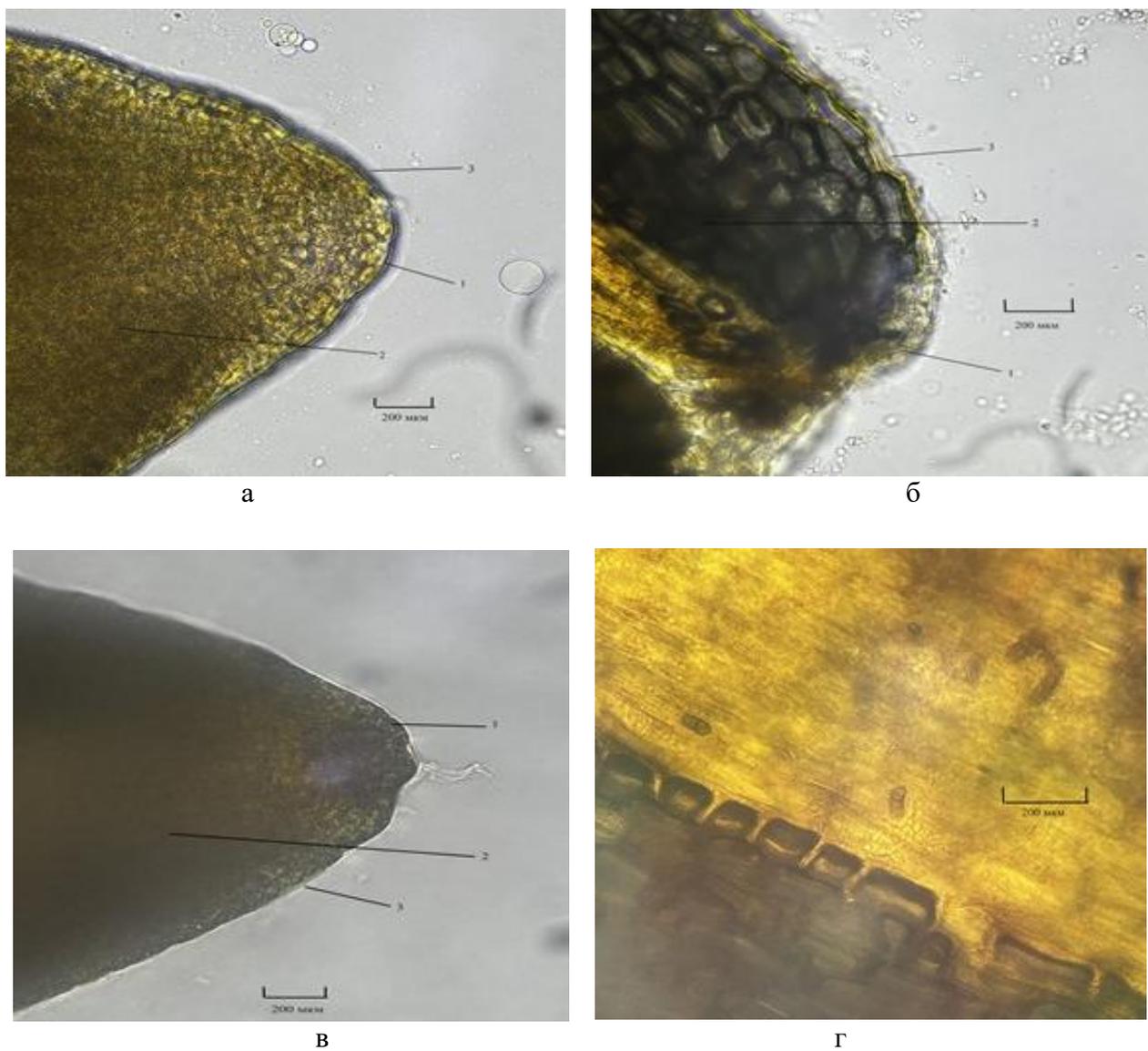
Рисунок 20 – СЭМ микроскопия поверхности семян *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь»

Таким образом, результаты СЭМ микроскопии семян *Ch. recutita* показывают, что криоконсервация не вызывает значительных изменений структуры семенной кожуры у всех исследованных сортов. Основные изменения касаются утолщения стенок ячеек и изменения поверхности воскового слоя (кутикулы). При этом, трещины и другие серьёзные повреждения, которые могли бы указывать на ухудшение качества семян после действия сверхнизких температур, не обнаружены. У некоторых сортов, таких как «Айболит» и «Старый лекарь», наблюдается незначительно разрушение воскового слоя, однако эпидермис остаётся целым. Это указывает на хорошую сохранность семян после криоконсервации.

#### 4.5 Анатомическое строение проростков сортов *Chamomilla recutita*

В процессе хранения семян в жидком азоте сверхнизкая температура может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на структуру и анатомическое строение семени, а также и проростков, выращенных из криоконсервированных семян. Для выявления возможных изменений в анатомическом строении семян и проростков нами было проведено изучение их анатомии. Были приготовлены давленные препараты как семян, так и проростков *Ch. recutita* 4-х сортов до и после криоконсервации для анализа и сравнения их анатомического строения.

Сравнение анатомического строения поверхностных препаратов семян *Ch. recutita* сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» показало (рисунок 21), что с периферии во всех семенах хорошо просматривается семенная кожура (экзокарп), пахистельного типа, многослойная, состоящая из почти прямоугольных клеток с утолщенными, слегка лигнифицированными оболочками. Во всех, выше перечисленных сортах семян, наружный слой семенной кожуры покрыт толстым слоем кутикулы.



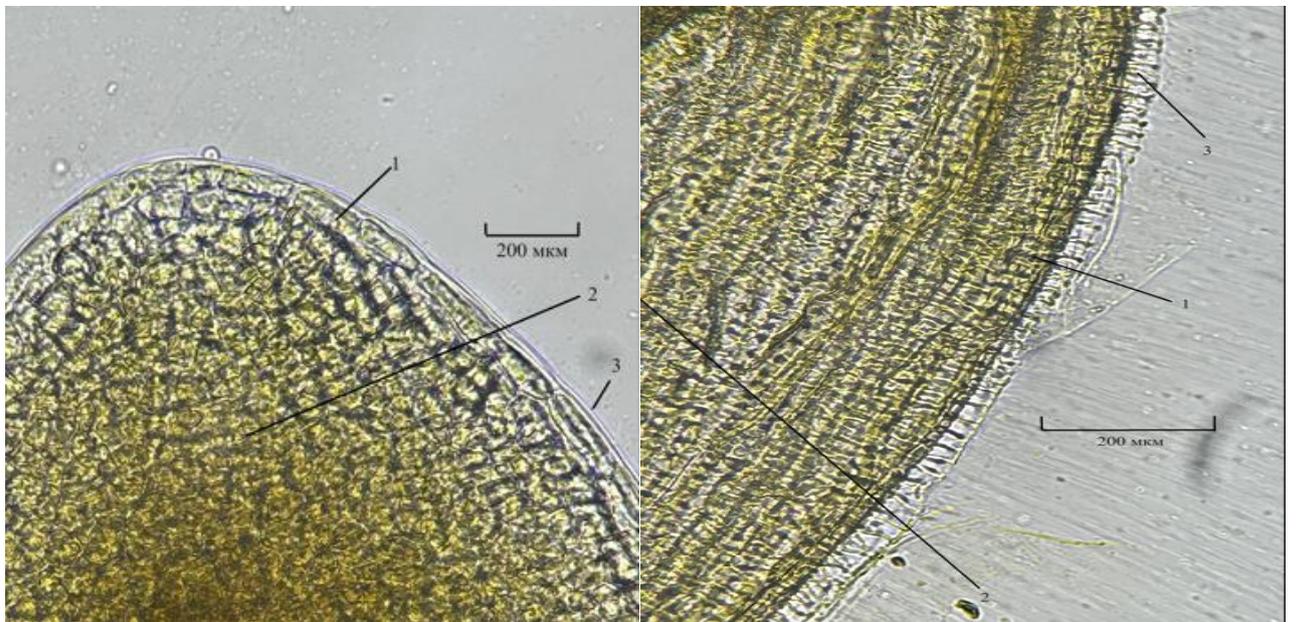
сорт «Карагандинская»: а – семя, боковой фрагмент (контроль); б – семя, фрагмент при основании (контроль); в – семя после криоконсервации, боковой фрагмент; г – семя после криоконсервации, фрагмент при основании: 1 – семенная кожура, 2 – эндосперм, 3 – кутикула

Рисунок 21 – Анатомические строения семян *Chamomilla recutita*, сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Поверхностные препараты, лист 1



д

е

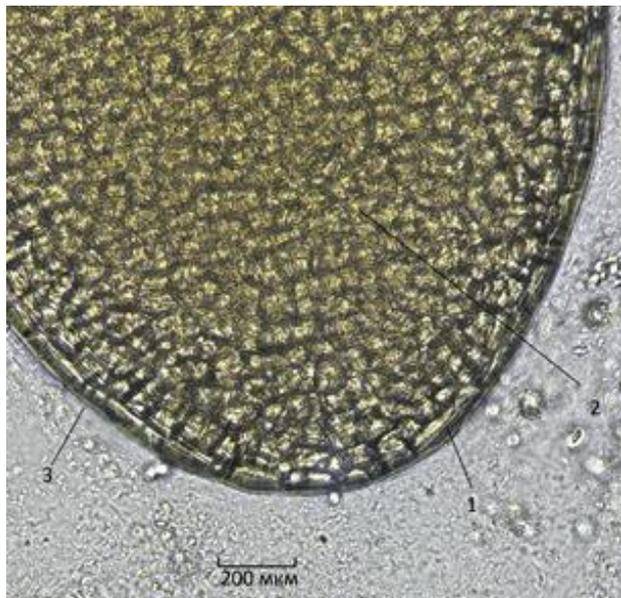


ж

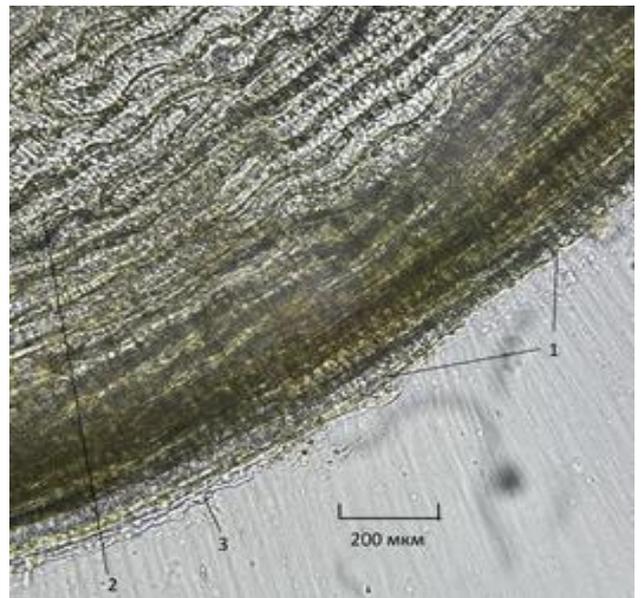
и

*сорт «Подмосковная»:* д – семя, боковой фрагмент (контроль); е – семя, фрагмент при основании (контроль); ж – семя после криоконсервации, боковой фрагмент; и – семя после криоконсервации, фрагмент при основании; 1 – семенная кожура, 2 – эндосперм, 3 – кутикула

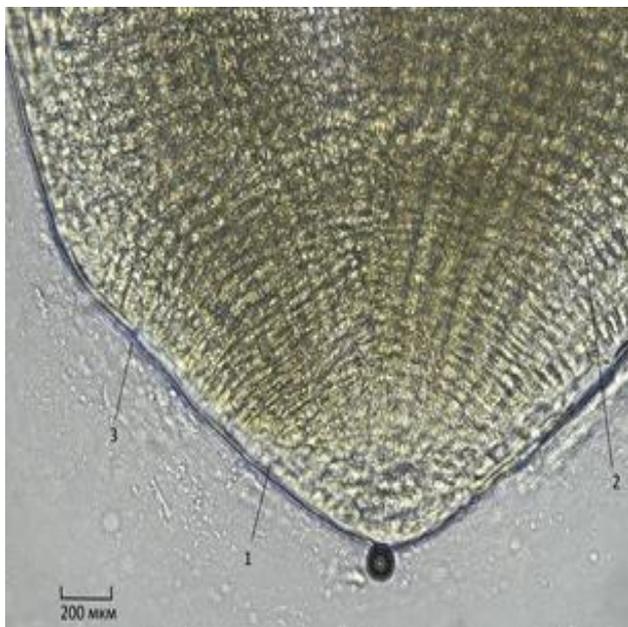
Рисунок 21, лист 2



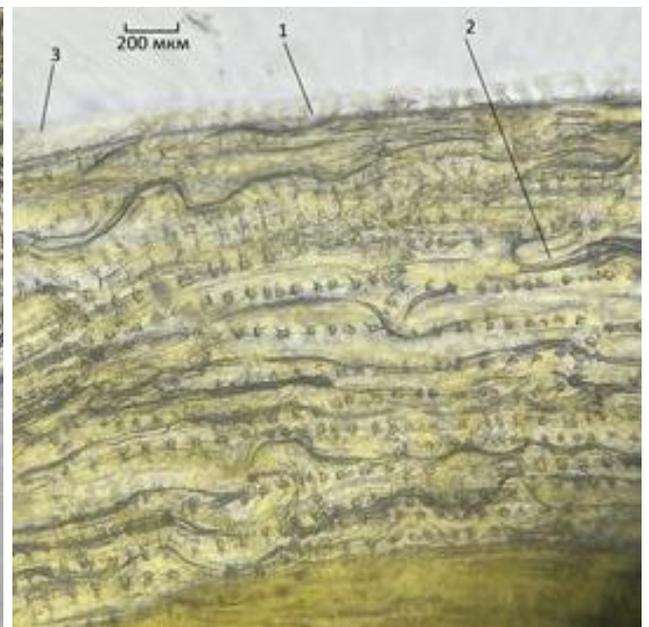
К



Л



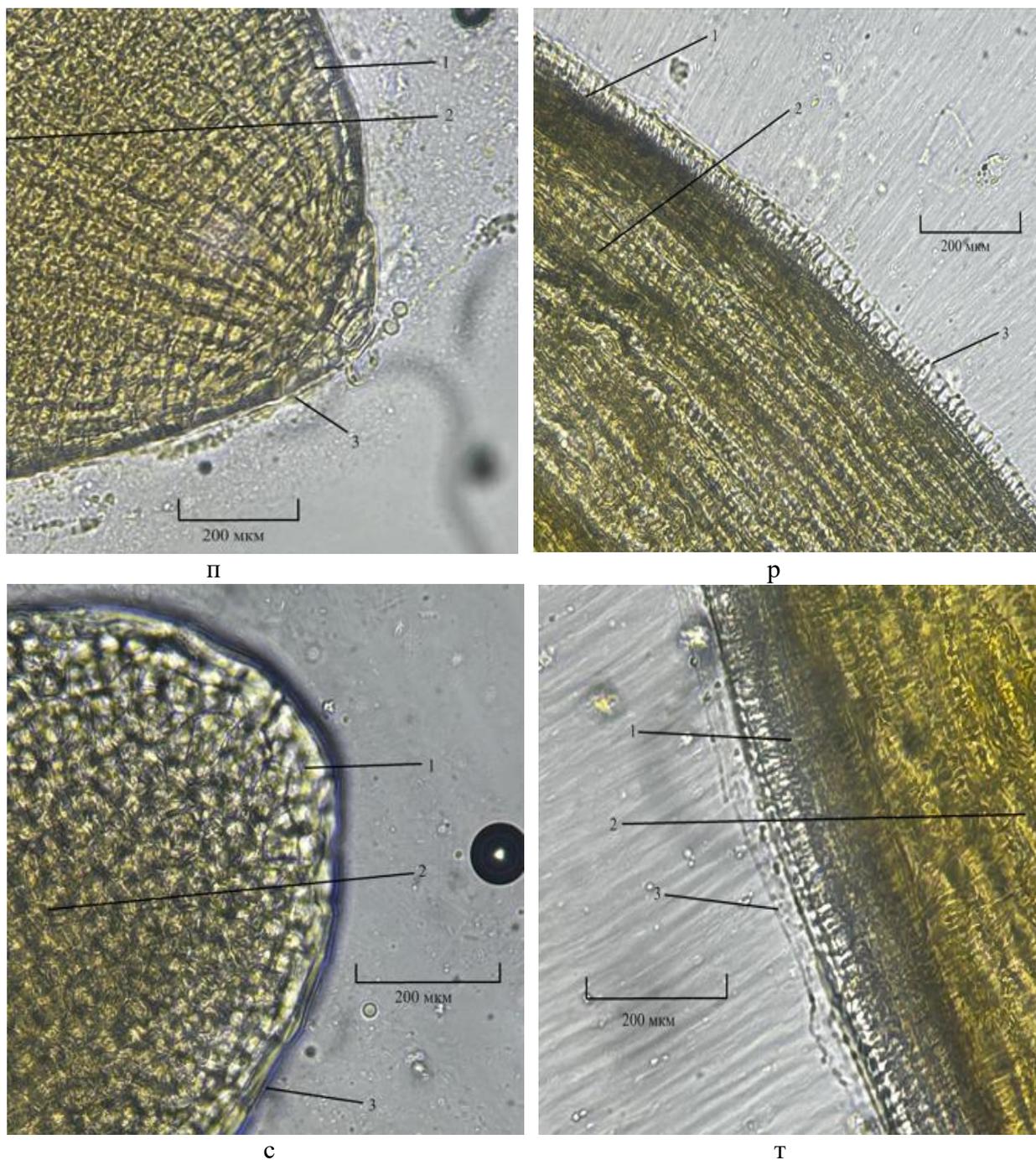
М



Н

*сорт «Айболит»*: к – семя, боковой фрагмент (контроль); л – семя, фрагмент при основании (контроль); м – семя после криоконсервации, боковой фрагмент, н – семя после криоконсервации, фрагмент при основании: 1 – семенная кожура, 2 – эндосперм, 3 – кутикула

Рисунок 21, лист 3

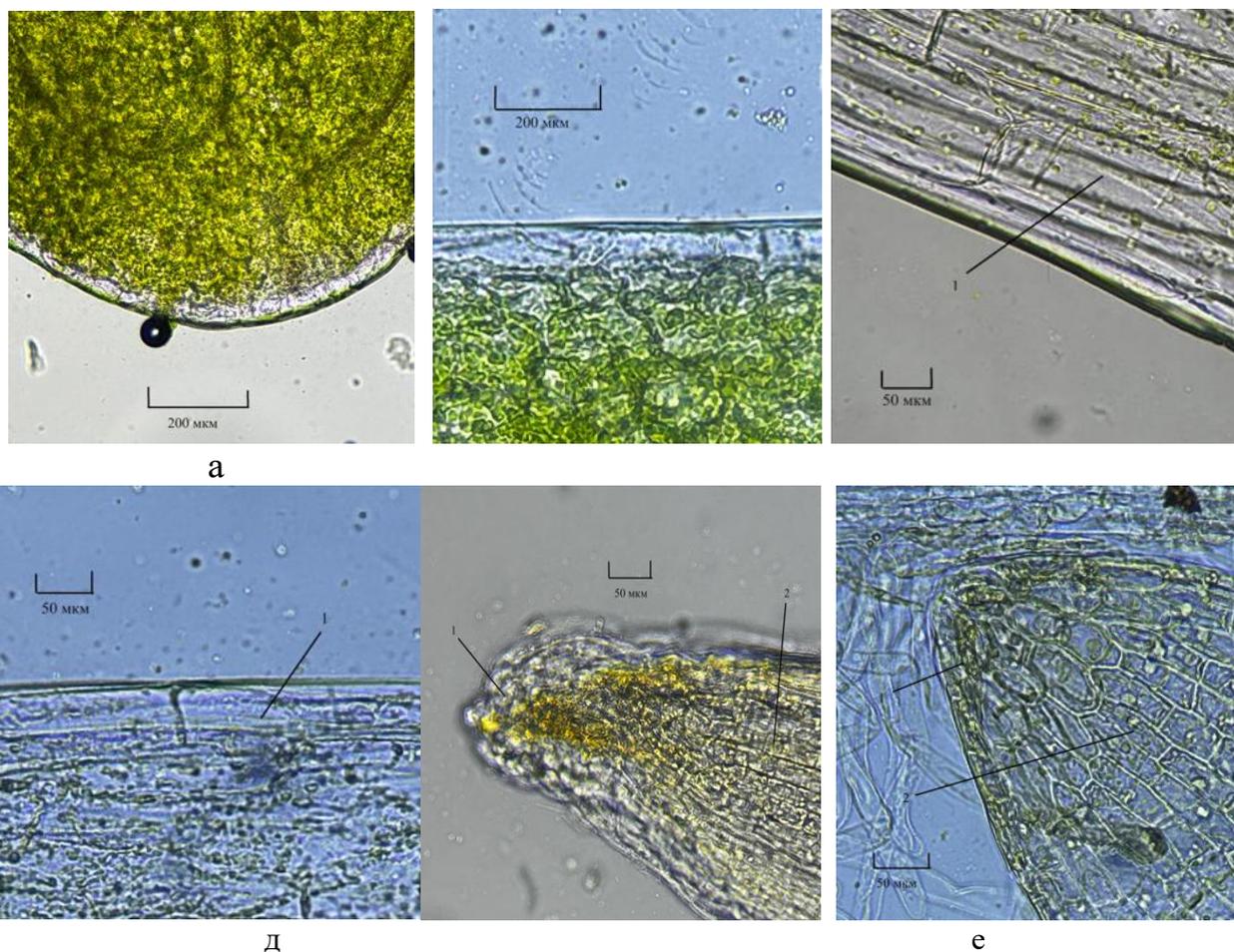


*сорт «Старый лекарь»*: п – семя, боковой фрагмент (контроль); р – семя, фрагмент при основании (контроль); с – семя после криоконсервации, боковой фрагмент; т – семя после криоконсервации, фрагмент при основании: 1 – семенная кожура, 2 – эндосперм, 3 – кутикула

Рисунок 21, лист 4

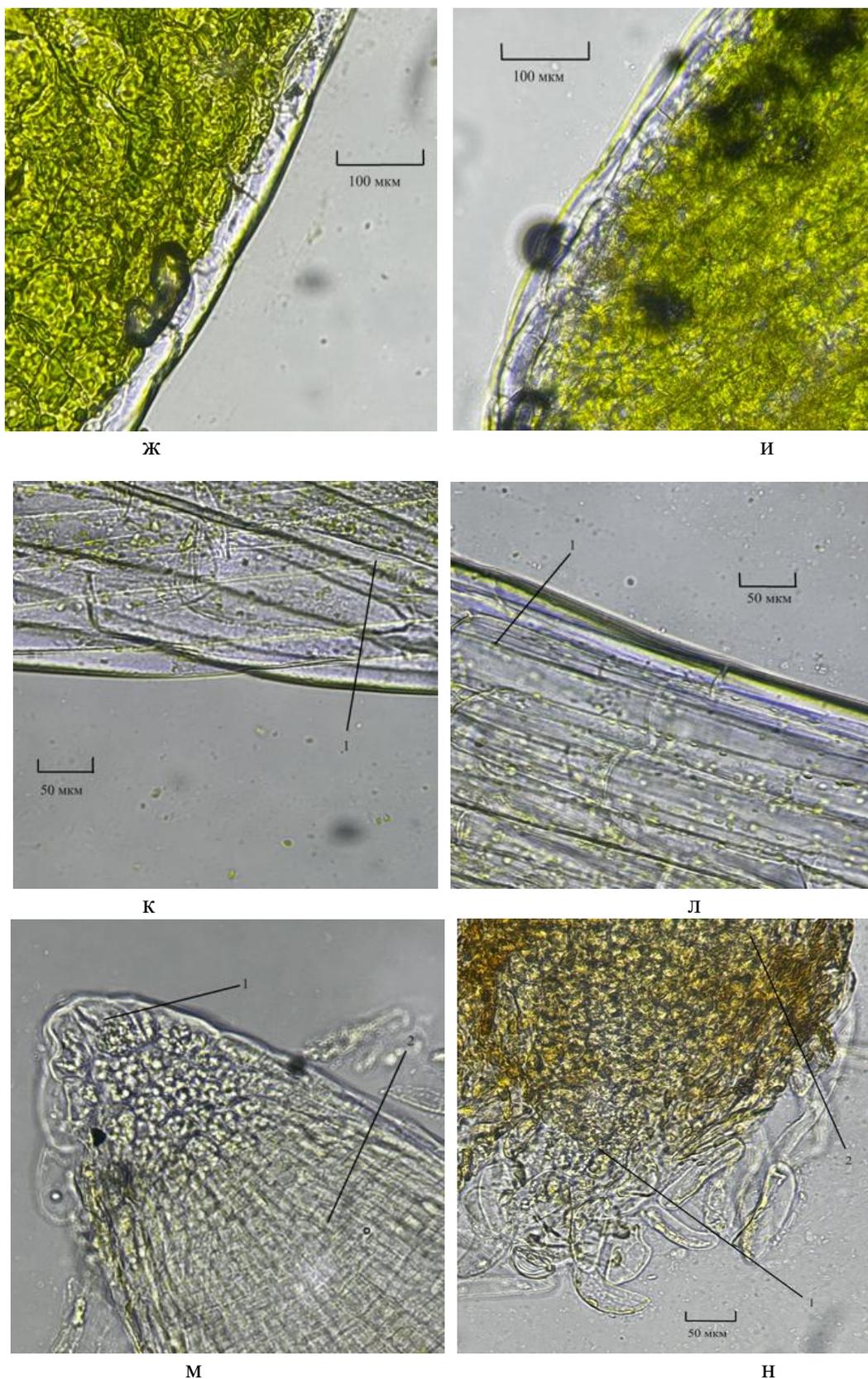
Как видно на рисунке 21 во всех сортах эндосперм в семени занимает значительный объем, клетки его эллиптической формы с утолщенными и прямыми стенками, имеющими многочисленные поры. Сравнение микроскопических структур показало, что после хранения в жидком азоте наблюдается уменьшение толщины кутикулы на семенной кожуре, но структуры семенной кожуры и эндодерма изменений не претерпевают.

Поверхностный препарат семядольных листьев *Ch. recutita* сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» до и после криоконсервации в жидком азоте представлен просвечивающимся по краю эпидермисом, состоящим из 1-го слоя клеток эллиптической формы. Внутренняя часть заполнена дифференцированным мезофиллом, состоящим из клеток овальной и слегка вытянутой формы, ярко-зеленого цвета (рисунок 22).



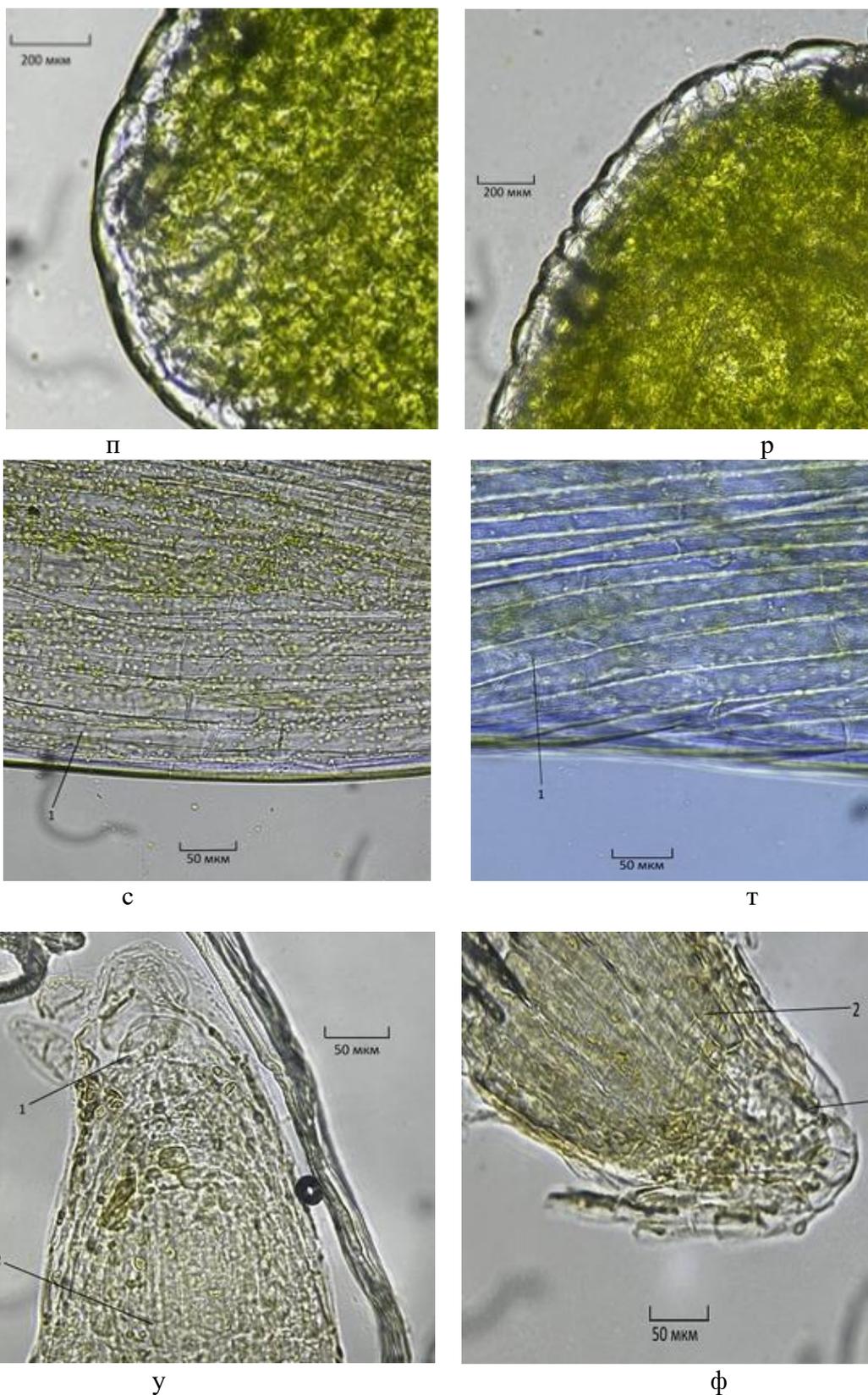
сорт «Карагандинская»: а – фрагмент семядольного листа (контроль); б – фрагмент семядольного листа после криоконсервации; в – препарат hypocotилия (контроль): 1 – эпидермис; г – препарат hypocotилия после криоконсервации: 1 – эпидермис; д – кончик главного корня (контроль): 1 – корневой чехлик, 2 – ризодерма; е – кончик корня после криоконсервации: 1 – корневой чехлик, 2 – ризодерма

Рисунок 22 – Анатомические строения проростков *Chamomilla recutita*, сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» до и после криоконсервации, лист 1



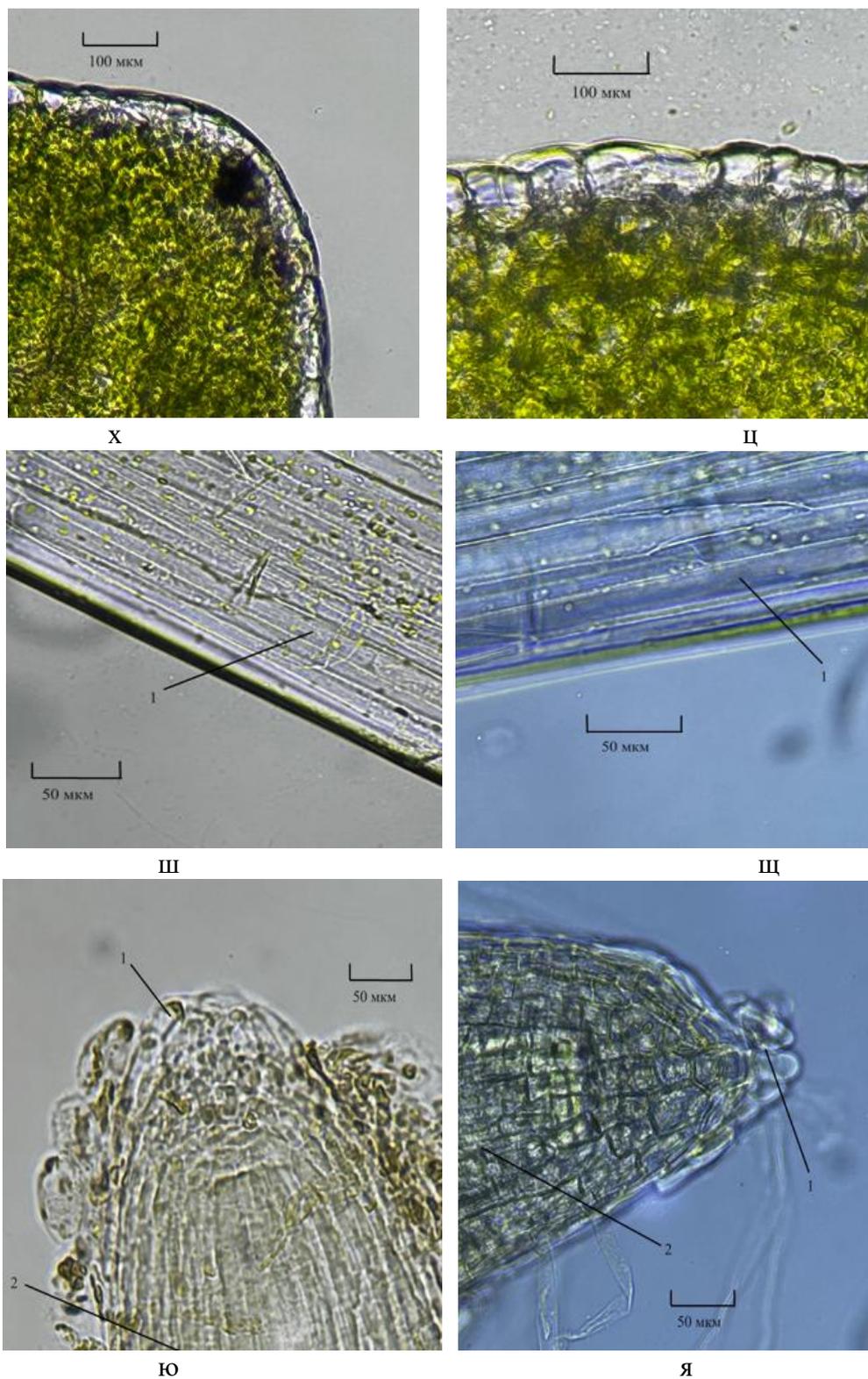
*сорт Подмосковная*: ж – фрагмент семядольного листа (контроль); и – фрагмент семядольного листа после криоконсервации; к – препарат гипокотилия (контроль): 1 – эпидермис; л – препарат гипокотилия после криоконсервации: 1 – эпидермис; м – кончик главного корня (контроль): 1 – корневой чехлик, 2 - ризодерма; н – кончик корня после криоконсервации: 1 – корневой чехлик, 2 - ризодерма

Рисунок 22, лист 3



*сорт «Айболит»*: п – фрагмент семядольного листа (контроль); р – фрагмент семядольного листа после криоконсервации; с – препарат гипокотилия (контроль): 1 – эпидермис, т – препарат гипокотилия после криоконсервации: 1 – эпидермис; у – кончик главного корня (контроль): 1 – корневой чехлик, 2 – ризодерма; ф – кончик корня после криоконсервации: 1 – корневой чехлик, 2 – ризодерма

Рисунок 22, лист 4



*сорт «Старый лекарь»*: х – фрагмент семядольного листа (контроль); ц – фрагмент семядольного листа после криоконсервации; ш – препарат гипокотыля (контроль): 1 – эпидермис; щ – препарат гипокотыля после криоконсервации: 1 - эпидермис; ю – кончик главного корня (контроль): 1 – корневой чехлик, 2 - ризодерма; я – кончик корня после криоконсервации: 1 – корневой чехлик, 2 - ризодерма

Рисунок 22, лист 6

Примечание – Поверхностные препараты

Поверхностный препарат гипокотилия представлен эпидермисом. Клетки его имеют прямоугольную вытянутую форму. Мембрана клеток тонкая и прямая.

Главный корень имеет небольшой по размеру корневой чехлик с крупными овальными клетками (рисунок 22). Выше начинается зона вытягивания, представленная клетками ризодермы, вытянутой формы. Не выявлено никаких отличий в строение проростков, полученных из семян, хранившихся при обычных условиях и в жидком азоте.

#### **4.6 Влияние тары на жизнеспособность семян сортов *Chamomilla recutita* после криоконсервации**

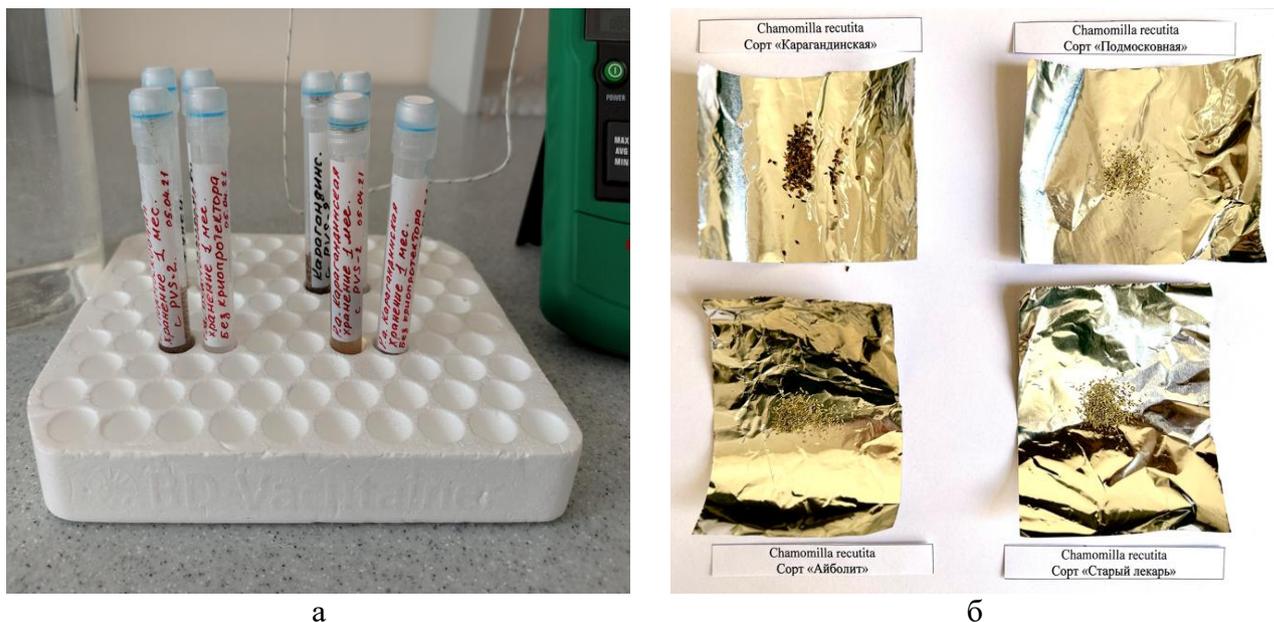
Традиционные методы хранения семян не способны обеспечить сохранность жизнеспособности семян в течение долгого времени. В процессе хранения семена могут пересыхать, подвергаться заражению грибами, плесенью и т.д., что в последствии может негативно повлиять на всхожесть. Альтернативным и современным методом является криоконсервация. Данный метод позволяет хранить семена в жидком азоте при температуре - 196°C. В условиях со сверхнизкой температурой в биологических материалах, в том числе и в семенах замедляются, а затем и останавливаются практически все физиологические и биохимические процессы. Также в таких сверхнизких температурах исключаются действия различного рода микроорганизмов. В жидком азоте семена могут храниться неограниченное время в неизменном состоянии.

На базе биологического факультета Карагандинского университета имени академика Е.А. Букетова в лаборатории исследовательского парка «Биотехнологии и экомониторинга» создан криогенный банк для хранения семян многих лекарственных растений.

При оценке условий криозамораживания семенного материала *Ch. recutita* перед нами стояла цель подобрать наилучшую тару, в которой семена будут замораживаться. Тара играет важную роль при криоконсервации семян, так как она обеспечивает защиту семян от внешних факторов, которые могут негативно повлиять на процесс криозамораживания и хранения. Хорошая тара обеспечивает равномерное распределение сверхнизкой температуры и защищает семена от резких перепадов и возможных температурных колебаний. Для криоконсервации обычно используются специализированные контейнеры, такие как пластиковые или стеклянные пробирки с герметичными крышками, которые могут обеспечить требуемую защиту и условия хранения [219].

В качестве объектов исследования были выбраны семена сортов «Подмосковная», «Карагандинская», «Айболит» и «Старый лекарь». При криоконсервации семян исследуемых сортов были использованы два вида тары - пластиковые криопробирки и конверты из фольги (рисунок 23). Тары с семенами погружались в жидкий азот в специальных цилиндрах, которые устанавливались в сосуды Дюара. Время экспозиции в жидком азоте составляла 7 суток. Оттаивание семенного материала проводилось в условиях комнатной

температуры. Далее семена высаживались в чашки Петри для определения лабораторной всхожести.



а – 1 – пластиковая криобирка; б – 2 – тара из фольги

Рисунок 23 – Криоконсервация семян сортов *Chamomilla recutita* в различных видах тары

Результаты исследования показали, что во всех исследуемых сортах *Ch. recutita* значения всхожести и энергии прорастания после криоконсервации были выше у семян, которые замораживались в пластиковых криобирках. Так, например, у семян сорта «Подмосковная» всхожесть в варианте при замораживании в криобирках составила 92,2%, что на 58,4% выше, чем всхожесть семян при использовании в качестве тары фольги (всхожесть – 33,8%). Значительно выше также оказалась и энергия прорастания, которая показала 88,4% (таблица 9). Семена сортов «Карагандинская» и «Айболит» также лучше отреагировали на замораживание в криобирках. Всхожесть семян указанных сортов, при данной заморозке составила 72 и 74%, а при использовании фольги 42 и 44%. У сорта же «Старый лекарь» отличия между замораживанием в криобирках и фольге оказались незначительными, но все же немного выше значения всхожести были при использовании криобирок во время криохранения. Всхожесть семян составила 37%, а при замораживании в фольге 32%.

Таблица 9 – Значения всхожести и энергии прорастания семян сортов *Chamomilla recutita* при криоконсервации в различных видах тары.

Сорта <i>Ch. recutita</i>	Вид тары	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %
1	2	3	4
Подмосковная	Пластик	92,2±3,5*	88,4±2,3
	Фольга	33,8±0,5	27,7±0,3

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4
Карагандинская	Пластик	72±3,2*	68±3,3
	Фольга	42±10,6	37±11,9
Айболит	Пластик	74±5,2*	67±6,0
	Фольга	44±7,3	36±8,2
Старый лекарь	Пластик	37±3,8	33±5,0
	Фольга	32±11,7	27,5±9,0
* – всхожесть выше			

Таким образом, результаты исследования показали, что при криоконсервации семенного материала *Ch. recutita* рекомендуется использовать тару из пластика (криопробирки), так как всхожесть семян во всех сортах была выше именно при замораживании в данном типе тары.

#### 4.7 Оптимизация условий размораживания семян сортов *Chamomilla recutita* после криоконсервации

Объектами исследования являлись семена *Ch. recutita* четырех сортов «Карагандинская», «Айболит», «Старый лекарь» и «Подмосковная». В данной работе перед нами стояла задача оптимизации условий размораживания после криоконсервации семян *Ch. recutita*. Известно, что оптимизация условий размораживания семян при криоконсервации необходима для сохранения жизнеспособности семян, так как быстрое или неправильное размораживание может вызвать повреждение клеток из-за формирования крупных кристаллов льда (рекристаллизация) из-за быстрого перепада температуры. Также оптимизация условий размораживания помогает избежать стресса клеток от температурных изменений и восстановить их нормальное функционирование после размораживания. Корректные условия размораживания обеспечивают максимальный выход жизнеспособных семян и увеличивают процент успешного прорастания. Таким образом, оптимизация условий размораживания играет ключевую роль в сохранении генетического материала и успешном возобновлении жизнедеятельности семян после криоконсервации [167, с. 6-600].

В связи с выше изложенным, криоконсервацию семян *Ch. recutita* проводили методом прямого погружения семян в пластиковых пробирках в сосуды Дюара с жидким азотом (-196°C). После криогенного хранения криопробирки с семенами размораживали при комнатной температуре до полного оттаивания и на водяной бане +40°C. Жизнеспособность семенного материала оценивали по лабораторной всхожести. Контрольная группа семян хранилась в сухом, темном месте в бумажной таре. Всхожесть рассчитывалась, как отношение числа проросших семян к числу первоначально заложенных на проращивание и выражалась в процентах. После оттаивания все семена ставили на проращивание в чашки Петри по 100 шт. в четырехкратной повторности на двухслойной фильтровальной бумаге, предварительно смоченной дистиллированной водой (рисунок 24). Чашки Петри с семенным материалом

помещали в климатическую камеру (Binder) при температуре +24°C с постоянным освещением.



Сорт «Карагандинская»



Сорт «Айболит»



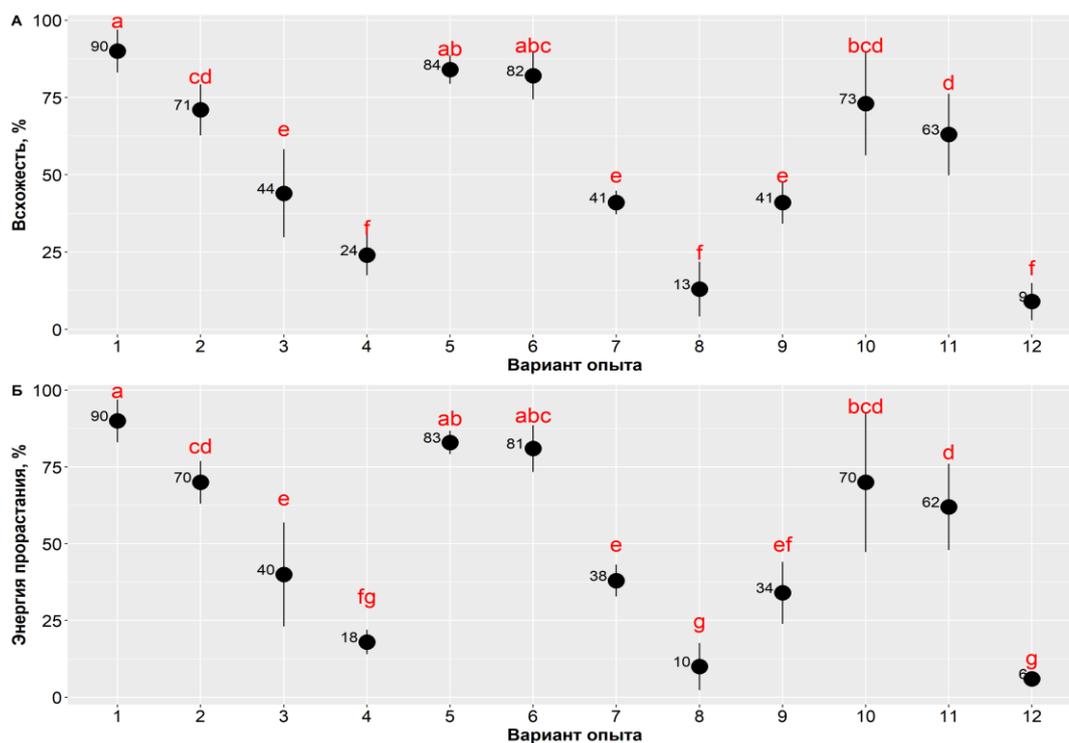
Сорт «Старый лекар»



Сорт «Подмосковная»

Рисунок 24 – Определение жизнеспособности семян сортов *Chamomilla recutita* в лабораторных условиях после криоконсервации с различными режимами размораживания

Результаты анализа данных продемонстрировали, что семена сорта «Карагандинская» показали наибольшую всхожесть в контрольной группе, достигнув 90%. После криосохранения с медленным размораживанием данный показатель снизился до 84%, что на 6% меньше по сравнению с контрольными образцами. Самая низкая всхожесть была зафиксирована у семян, размороженных на водяной бане, и составила всего 41%. Энергия прорастания изменялась аналогично показателям всхожести: в контрольной группе она составила 90%, после криосохранения с медленным размораживанием – 83%, при быстром размораживании – 34% (рисунок 25).



1 - Карагандинская-Контроль; 2 - Айболит-Контроль; 3 - Старый лекарь-Контроль; 4 – Подмосковная-Контроль; 5 – Карагандинская-Медленное размораживание; 6 - Айболит-Медленное размораживание; 7 - Старый лекарь-Медленное размораживание; 8 – Подмосковная-Медленное размораживание; 9 – Карагандинская-Быстрое размораживание; 10 - Айболит-Быстрое размораживание; 11 - Старый лекарь-Быстрое размораживание; 12 – Подмосковная-Быстрое размораживание. Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Рисунок 25 – Изучение всхожести и энергии прорастания семян сортов *Chamomilla recutita* после криогенного хранения с различными типами размораживания

Для сорта «Айболит» результаты показали, что всхожесть семян в опытной группе с медленным размораживанием увеличилась на 11% по сравнению с контролем, а при быстром размораживании на 2%. Значения составили 82 и 73% соответственно. При этом контрольная группа продемонстрировала наименьшую всхожесть – 71%. Аналогичная тенденция наблюдается и по энергии прорастания: в контрольной группе она составила 70%, после криоконсервации с медленным размораживанием – 81%, а с быстрым размораживанием – 70% (рисунок 25). Эти данные подтверждают положительное влияние криоконсервации на жизнеспособность семян *Ch. recutita*. Для данного сорта оптимальным методом разморозки оказалось медленное оттаивание при комнатной температуре.

Согласно данным, представленным на рисунке 24, сорт «Старый лекарь» лучше всего реагировал на криоконсервацию при быстром размораживании. Всхожесть семян достигла 63%, а энергия прорастания – 62%. Наименьшие показатели были отмечены при криоконсервации с медленным размораживанием: всхожесть составила 41%, а энергия прорастания – 38%.

Значения контроля показали среднюю всхожесть и энергию прорастания – 44 и 40% соответственно.

У сорта «Подмосковная» жизнеспособность семян, как в контроле, так и в опытных группах оказалась наименьшей по сравнению с тремя предыдущими сортами. Так, криоконсервация семян и режимы оттаивания в данном случае не оказали какого-либо положительного влияния. Всхожесть и энергия прорастания семян контрольной группы составила 24,0 и 18,0%, криоконсервация с медленной разморозкой – 13,0 и 10,0%, криоконсервация с быстрой разморозкой – 9,0 и 6,0% (рисунок 25). Все же стоит отметить, что результаты всхожести при медленном размораживании выше показателей при быстром оттаивании после криоконсервации. Низкая всхожесть семян сорта «Подмосковная» после криоконсервации в жидком азоте может быть связана с рядом физических, биохимических и молекулярных процессов, происходящих на клеточном и субклеточном уровнях. При сверхглубоком замораживании растительные клетки подвергаются совокупному воздействию стресса, включающему осмотические, температурные, окислительные и гормональные компоненты, что приводит к нарушению целостности структур и потере физиологической активности. Как указывают Panis и Lambardi, одним из первичных и наиболее критичных факторов криоповреждений является образование льда в межклеточном пространстве, приводящее к осмотически индуцированному выходу воды из клетки. При нарушении динамики обезвоживания, особенно в случае чрезмерно быстрой или неполной дегидратации, возможно формирование кристаллов льда непосредственно в протопласте, что приводит к механическому разрушению мембран и гибели клеток [220]. Этот процесс особенно опасен для генотипов, характеризующихся высокой водонасыщенностью тканей, что может быть актуально для сорта «Подмосковная». Дополнительным повреждающим фактором, как подчеркивает Назаренко Л.В., является изменение физико-химического состояния мембранных липидов в условиях пониженной температуры. Фазовые переходы липидов из жидкокристаллического в гелеобразное, а затем и в гексанальное состояние приводят к потере текучести и проницаемости мембран, нарушению функционирования в мембранах белковых переносчиков и ионных каналов. Эти нарушения создают предпосылки для дисбаланса внутриклеточной среды, утраты ионного гомеостаза и, как следствие, для снижения жизнеспособности клеток [221, с. 54-56]. Не менее значимым механизмом криоповреждений является дефицит так называемых совместимых осмолитов и белков холодового ответа, таких как COR-белки, LEA-белки и дегидрины. Согласно Назаренко (2008), при недостаточной экспрессии этих защитных белков клетки теряют способность стабилизировать макромолекулы и поддерживать функциональную активность мембран в условиях дегидратации [221, с. 54-56]. Это может свидетельствовать о сниженной генетической способности сорта «Подмосковная» к эффективному ответу на криостресс. Ряд исследований, в том числе обзорных работ Kaczmarszyk и др., подтверждают, что при криоконсервации усиливается образование активных

форм кислорода (АФК), включая супероксид, перекись водорода и гидроксил-радикалы. Эти молекулы инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов, повреждение белков и ДНК. При недостаточной активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы – такие повреждения становятся необратимыми [222]. Дополнительный вклад в снижение жизнеспособности семян могут вносить эпигенетические изменения. Ли в соавт., а также Johnston и соавт., установили, что криостресс может вызывать деметилирование ДНК у чувствительных сортов, что, в свою очередь, нарушает стабильность экспрессии стресс-адаптивных генов и процессов регенерации после оттаивания [223, 224]. Кроме того, следует учитывать гормональные нарушения. По данным Назаренко (2008), холодová дегидратация сопровождается увеличением концентрации абсцизовой кислоты (АБК), которая регулирует экспрессию генов холодового ответа. Однако избыточное накопление АБК, а также нарушение соотношения с другими фитогормонами (в частности, гиббереллинами) могут угнетать прорастание и ослабить реакцию на стресс. Взаимодействие АФК с гормональной системой дополнительно усиливает физиологическую дестабилизацию, особенно у чувствительных сортов [221, с. 54-56]. Исходя из выше изложенного, снижение всхожести семян сорта «Подмосковная» после криоконсервации, по-видимому, обусловлено целым комплексом причин: морфофизиологической чувствительностью тканей к обезвоживанию, нарушением структурной организации мембран, дефицитом криопротективных веществ и белков, усилением окислительного стресса, эпигенетической нестабильностью и дисбалансом гормональной регуляции.

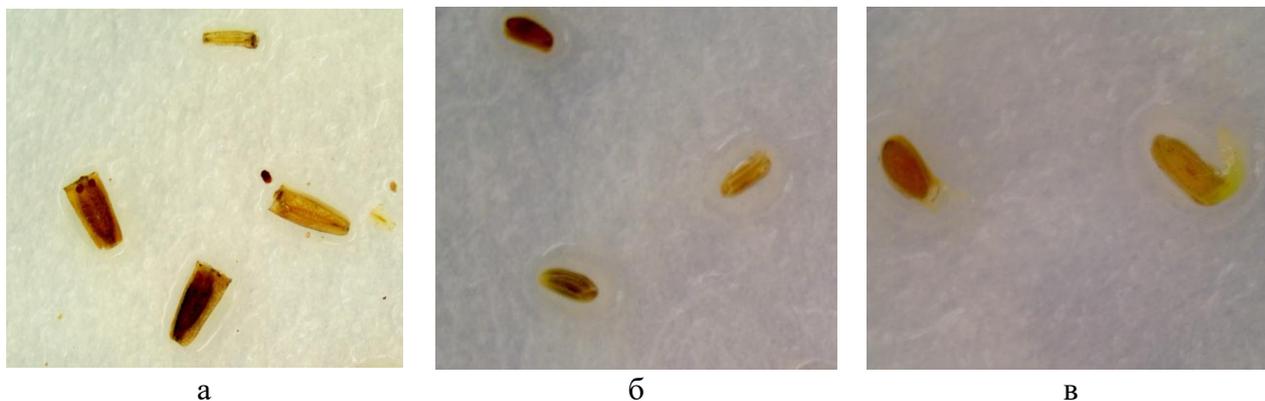
Таким образом, для обеспечения высокой жизнеспособности семян сортов *Ch. recutita* при хранении в жидком азоте, рекомендуется применять размораживание при комнатной температуре (+24°C). Такой режим оттаивания минимизирует повреждение клеток, связанные с резкими термическими перепадами, и способствует сохранению физиологических характеристик семян. Кроме того, медленное размораживание позволяет снизить риск образования крупных кристаллов льда при рекристаллизации, что важно для поддержания структуры и функциональности тканей семян.

Также перед нами стояла цель изучить биологию прорастания семян *Chamomilla recutita* и анализ сортовых различий в морфометрии проростков после криоконсервации и режимов оттаивания.

Наблюдения за биологией прорастания семян *Chamomilla recutita* проводили в лабораторных условиях в чашках Петри. Ежедневно отмечали изменения в произрастании семян всех сортов, а именно набухание семян, разрыв семенной оболочки, развитие корешка, формирование стебля (гипокотилия) и семядольных листьев. Измерение морфометрических показателей проростков сортов *Chamomilla recutita* проводили на 3-й день, 7-й день и на 15-е сутки.

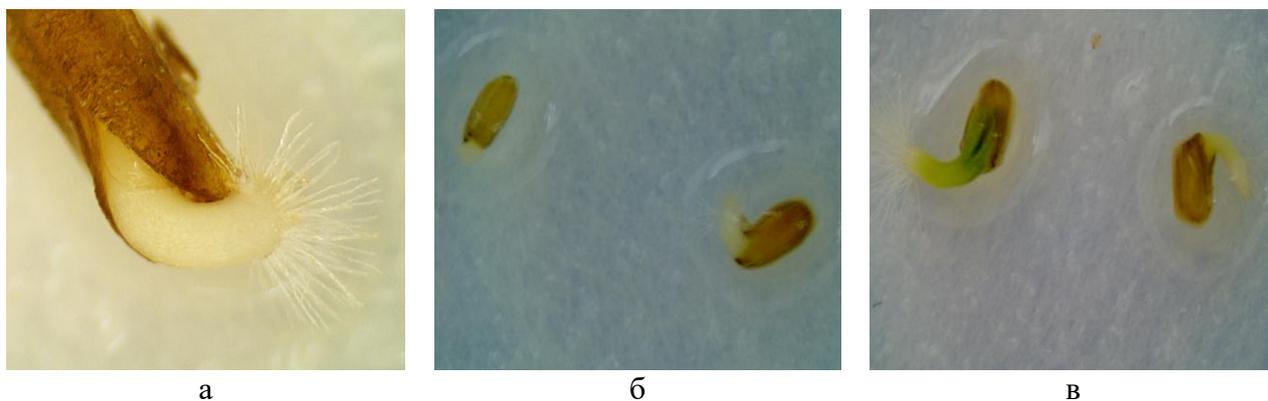
Результаты наблюдения показали, что в процессе роста семян *Chamomilla recutita* на второй день эксперимента отмечено набухание и ослизнение семян

во всех сортах и вариантах опыта (рисунок 26). Наклеивание корешков происходило на 3-й день у сорта «Карагандинская» и «Айболит» во всех вариантах опыта. У сорта же «Старый лекарь» корешок вышел на 4-й день (рисунок 27). На следующий день во всех сортах и вариантах опыта отмечено появление гипокотиля белого цвета. Остальная часть оставалась скрытой в семенной кожуре. Затем гипокотиль выпрямлялся, вынося семядольные листья наружу, их раскрытие наблюдали через день (рисунок 28).



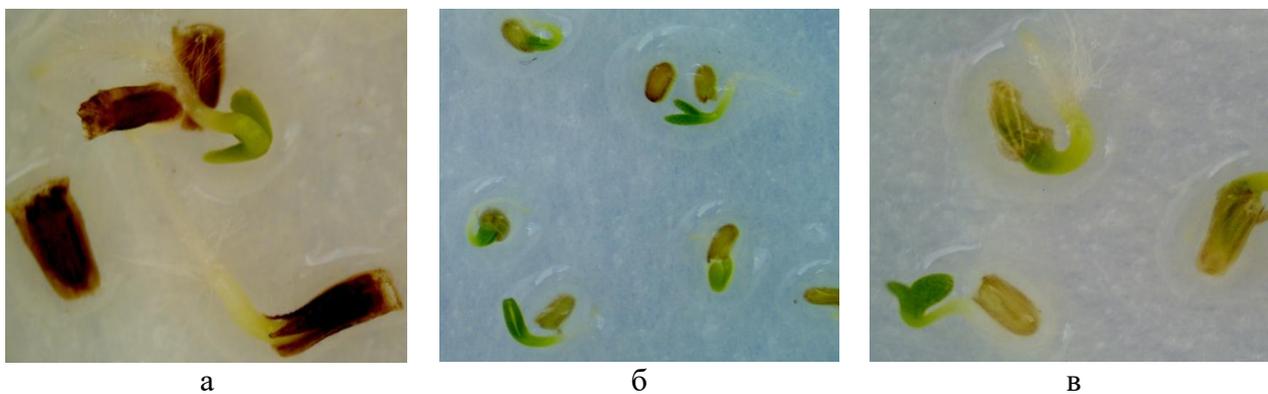
а – сорт «Карагандинская»; б – сорт «Айболит»; в – сорт «Старый лекарь»

Рисунок 26 – Набухание и ослизнение семян сортов *Chamomilla recutita*



а – сорт «Карагандинская»; б – сорт «Айболит»; в – сорт «Старый лекарь»

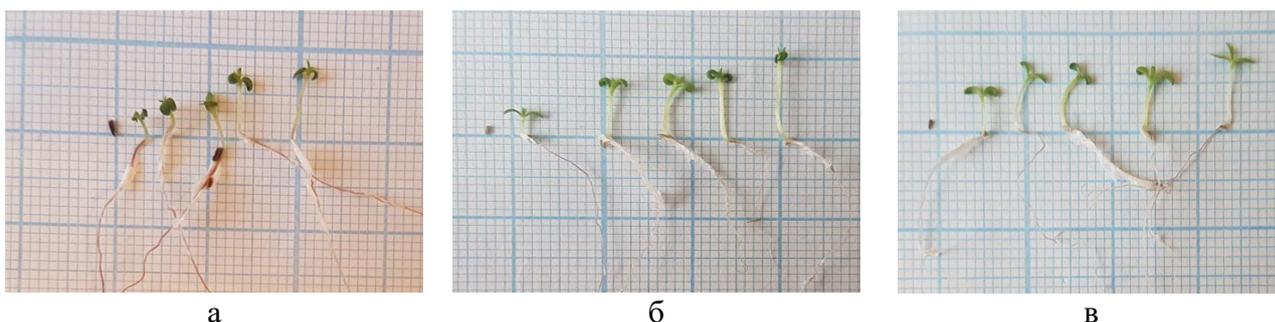
Рисунок 27 – Наклеивание корешков сортов *Chamomilla recutita*



а – сорт «Карагандинская»; б – сорт «Айболит»; в – сорт «Старый лекарь»

Рисунок 28 – Появление гипокотиля и выход семядольных листьев  
*Chamomilla recutita*

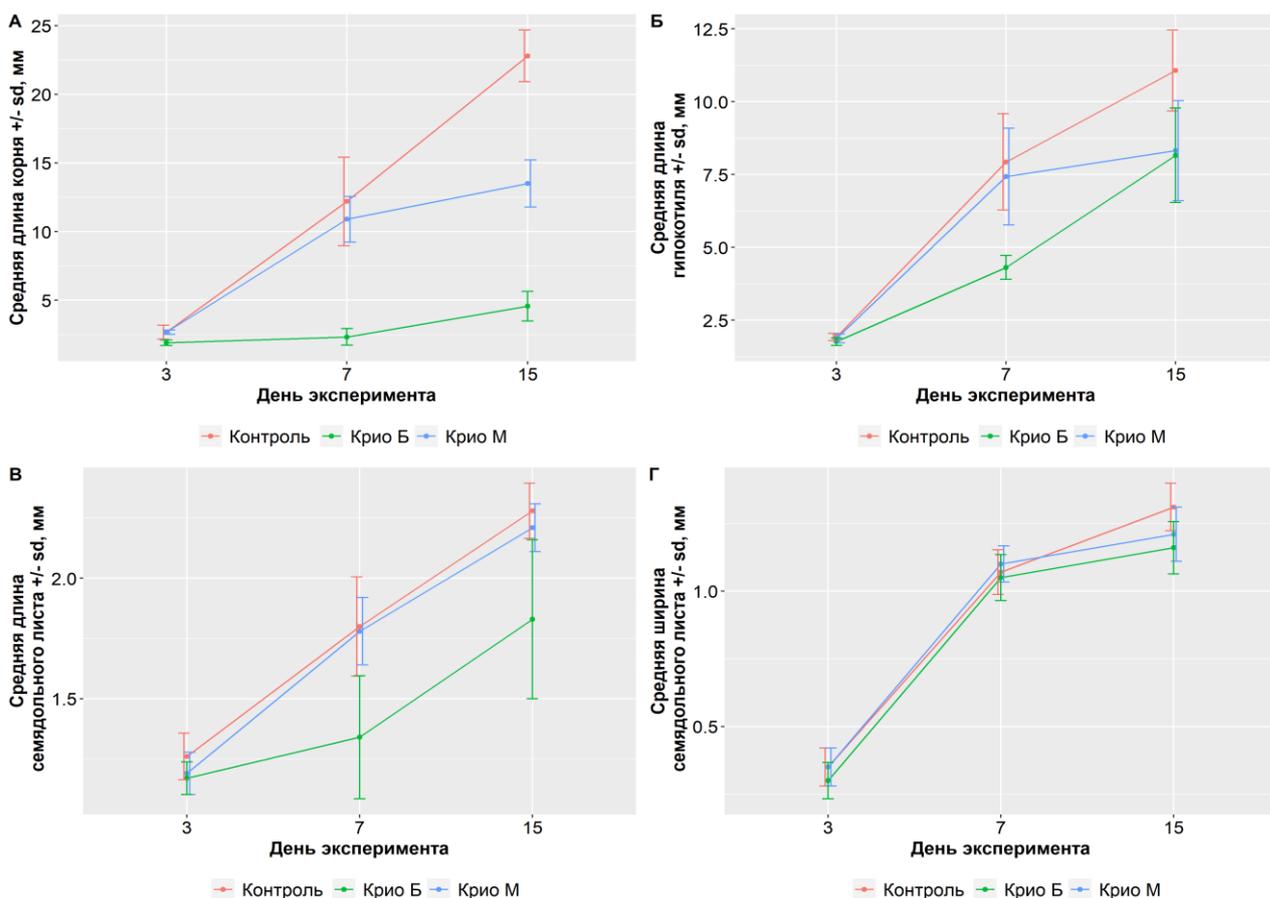
На рисунке 26 виден внешний вид семядольного листа, представляющий собой бочонковидную, слегка вытянутую форму, с закругленной верхушкой. Жилкование не выражено. У всех вариантов выпрямление гипокотиля отмечено на 8-9 день. К этому времени у проростков заметно происходит удлинение главного корня. На 7-11 день после появления семядольных листьев у некоторых проростков всех вариантов появлялись зачатки первой пары настоящих листьев в виде небольших зеленых бугорков (рисунок 29, Приложение Д).



а – сорт «Карагандинская»; б – сорт «Айболит»; в – сорт «Старый лекарь»

Рисунок 29 – Выход первой пары настоящих листьев *Chamomilla recutita*

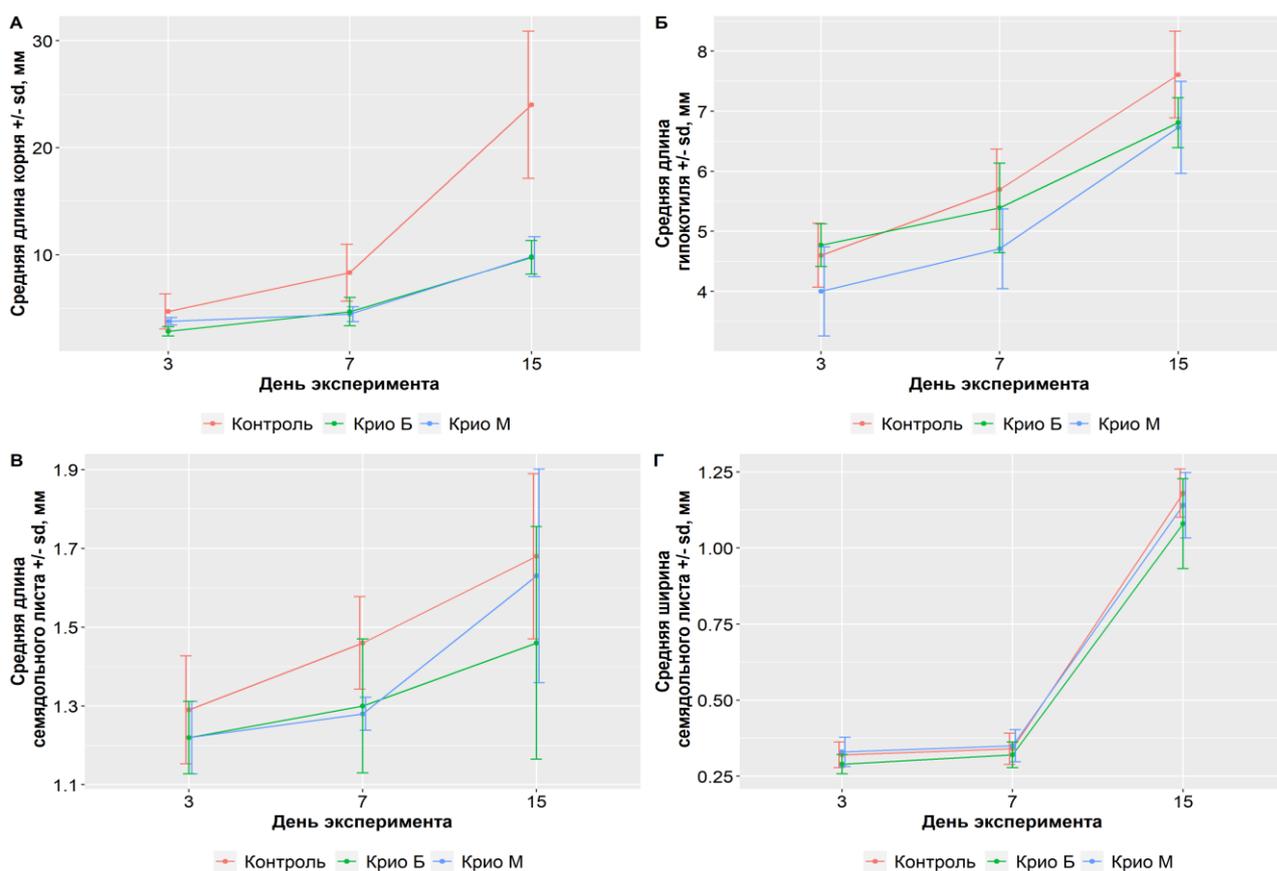
Результаты исследования морфометрических показателей проростков были следующими. Сорт «Карагандинская»: По длине корневой системы лучшие показатели в контроле, где наблюдается активный рост (с 2,9 мм до 21,6 мм). Наименьший рост в варианте при быстрой разморозке семян после криоконсервации (с 1,8 мм до 4,1 мм). Длина гипокотиля также превышает в контроле (на 15 сутки 11 мм). Значение длины семядольного листа практически одинакова как в контроле (2,28 мм), так и в варианте при медленной разморозке (2,21 мм). На 7 сутки и на 15 сутки идет их активный рост. В варианте при быстрой разморозке семян показатели длины листовой пластинки самые низкие (1,83 мм). Ширина листовой пластинки резко увеличивается на 7 сутки во всех вариантах опыта, затем наблюдается медленное увеличение на 15 сутки (рисунок 30).



3 – измерение проростков на третьи сутки; 7- измерение проростков на седьмые сутки; 15- измерение проростков на пятнадцатые сутки; Контроль; Крио Б – криоконсервация с быстрой разморозкой на водяной бане; Крио М – криоконсервация с медленной разморозкой при комнатной температуре

Рисунок 30 – Морфометрические показатели проростков *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» с применением режимов оттаивания после криоконсервации

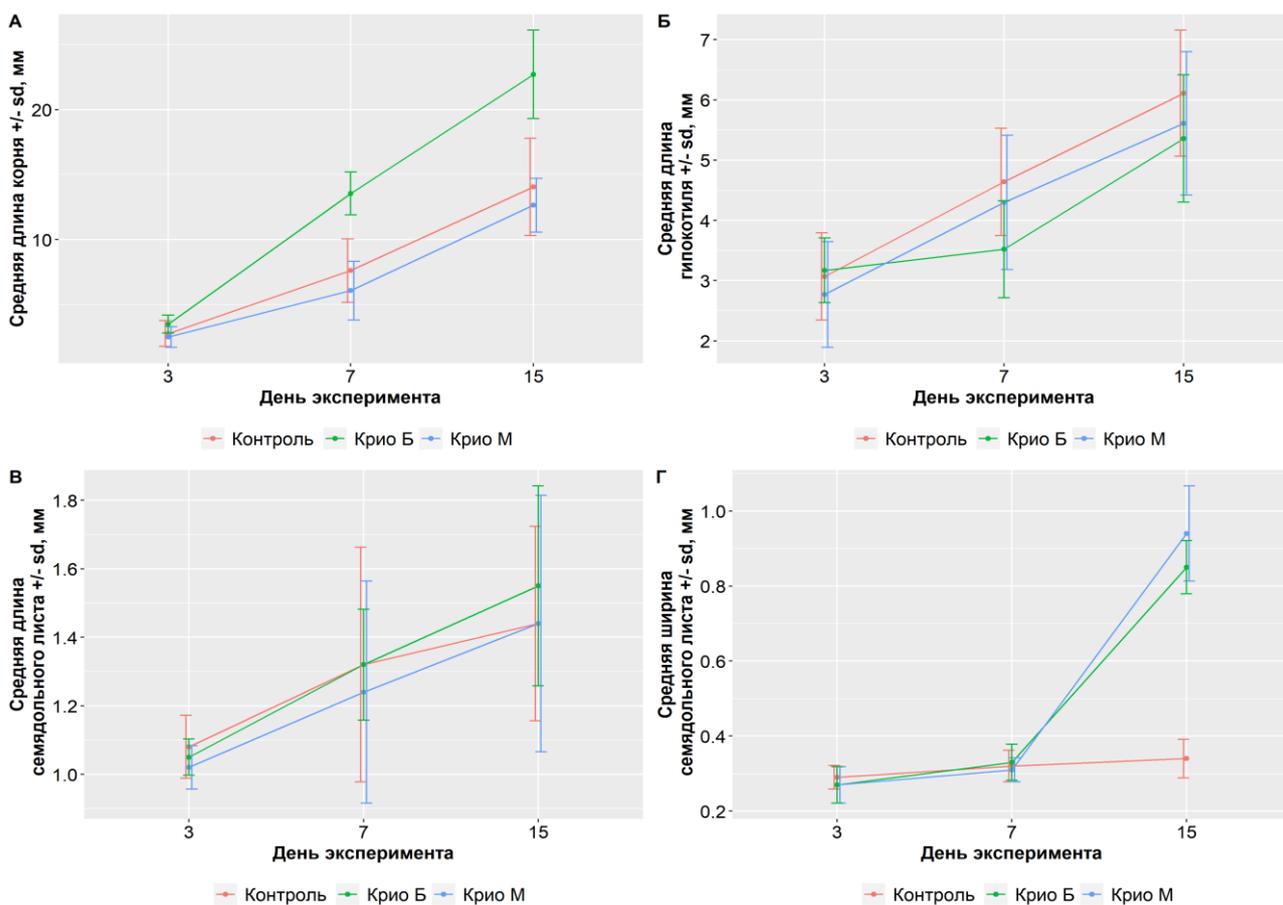
Сорт «Айболит»: Длина корня на 3 сутки практически одинаковая во всех вариантах опыта. На 7 сутки показатели контрольной группы превышают значения опытных групп и составляют 8,3 мм. На 15 сутки фиксируется резкое увеличение длины корня в контрольной группе – 24 мм, что значительно выше показателей опытных групп (медленное размораживание – 9,8 мм, быстрое размораживание – 9,7 мм). Средняя длина гипокотили на 3 сутки выше в варианте при быстрой разморозке – 4,7 мм. На 7 сутки увеличивается длина гипокотили в контрольной группе – 5,7 мм и на 15 сутки – 7,61 мм. Наименьшие показатели средней длины гипокотили в варианте при медленной разморозке, на 7 сутки – 4,7 мм, на 15 сутки – 6,7 мм. Показатели средней длины семядольного листа также выше в контрольной группе (1,3 мм, 1,4 мм, 1,6 мм). Средняя ширина семядольного листа резко увеличивается на 15 сутки одинаково во всех вариантах опыта (рисунок 31).



3 – измерение проростков на третьи сутки; 7- измерение проростков на седьмые сутки; 15- измерение проростков на пятнадцатые сутки; Контроль; Крио Б – криоконсервация с быстрой разморозкой на водяной бане; Крио М – криоконсервация с медленной разморозкой при комнатной температуре

Рисунок 31 – Морфометрические показатели проростков *Chamomilla recutita* сорта «Айболит» с применением режимов оттаивания после криоконсервации

Сорт «Старый лекарь»: Активный рост корневой системы зафиксирован при быстрой разморозке семян на 7 сутки (13,5 мм) и на 15 сутки (22,7 мм), что значительно выше показателей контроля и варианта при медленной разморозке. Средняя длина гипокотилля выше в контроле, на 7 сутки – 4,6 мм, на 15 сутки – 6,1 мм. Наименьшие показатели в варианте при быстрой разморозке, на 7 сутки – 3,5 мм, на 15 сутки – 5,3 мм. Средняя длина семядольного листа одинаково увеличивается во всех вариантах опыта, но резкого роста не наблюдается. Ширина семядольного листа резко увеличивается на 15 сутки в опытных группах. Так ширина листа в варианте при медленной разморозке составила 0,94 мм, при быстрой разморозке 0,85 мм. Значения контрольной группы оказались ниже – 0,34 мм (рисунок 32).



3 – измерение проростков на третьи сутки; 7- измерение проростков на седьмые сутки; 15- измерение проростков на пятнадцатые сутки; Контроль; Крио Б – криоконсервация с быстрой разморозкой на водяной бане; Крио М – криоконсервация с медленной разморозкой при комнатной температуре

Рисунок 32– Морфометрические показатели проростков *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь» с применением режимов оттаивания после криоконсервации

Морфометрические показатели проростков сорта «Подмосковная» не были измерены в связи с крайне низкой всхожестью семян данного сорта. Малое количество проросших семян не позволило нам собрать достаточный объем данных для проведения статистических расчетов.

Криогенное хранение в жидком азоте и применяемые методы размораживания не оказали существенного негативного влияния на биологические процессы прорастания семян *Ch. recutita*. Однако наблюдаются незначительные различия в морфометрических характеристиках проростков, которые зависят от особенностей конкретного сорта семян. Для сохранения жизнеспособности и обеспечения равномерного прорастания семенного материала ромашки аптечной рекомендуется размораживание при комнатной температуре, что обеспечивает равномерное и щадящее оттаивание.

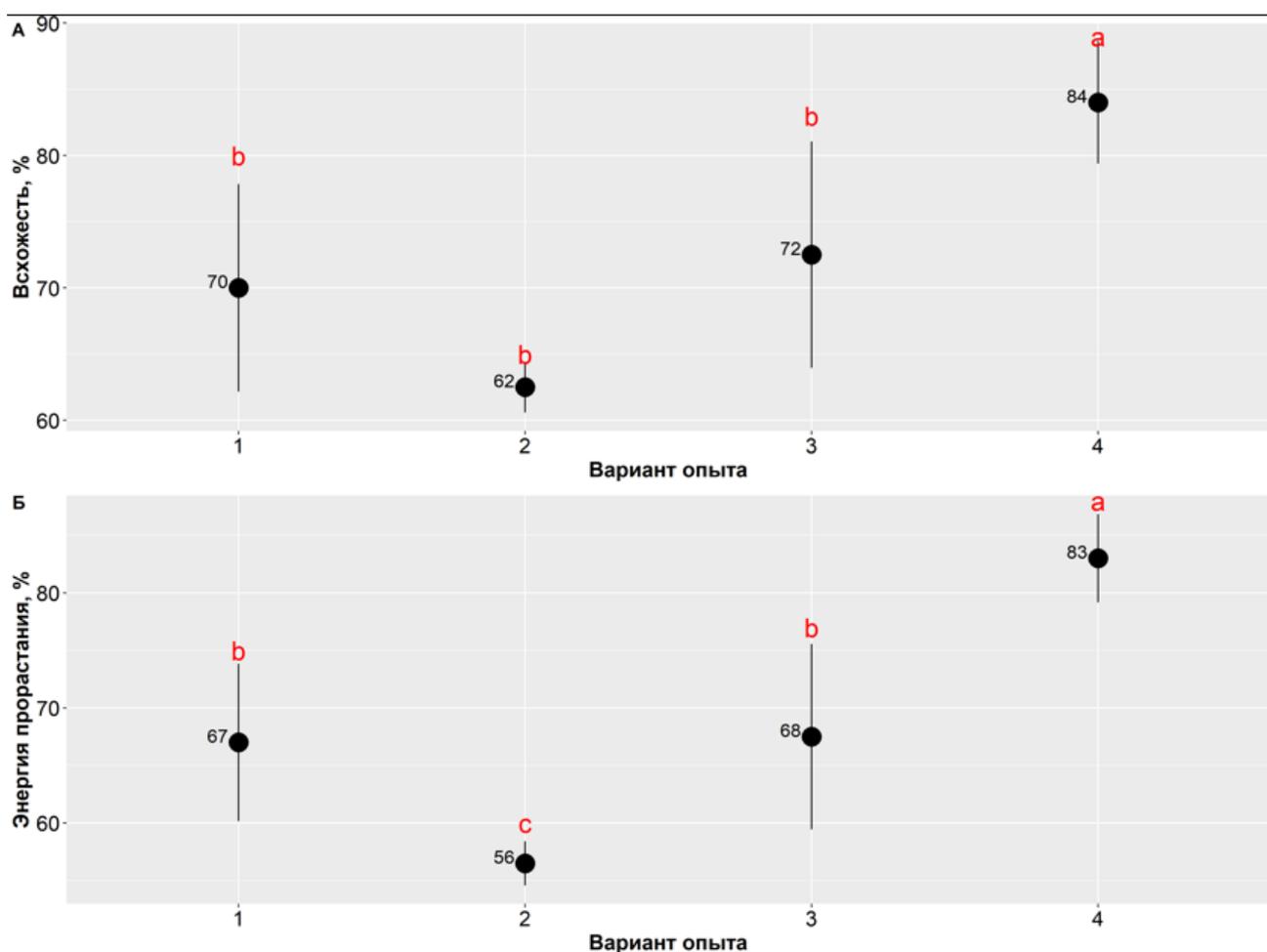
#### 4.8 Влияние краткосрочного и долгосрочного криохранения на всхожесть семян сортов *Chamomilla recutita*

Согласно литературным данным, длительность хранения семян в условиях жидкого азота, как правило, не оказывает существенного отрицательного влияния на их всхожесть, если соблюдены все этапы и протоколы криоконсервации. Это объясняется тем, что при таких сверхнизких температурах биохимические и физиологические процессы в клетках практически полностью прекращаются. Замедление метаболической активности предотвращает процессы старения и деградации, что позволяет эффективно сохранять жизнеспособность семян в течение продолжительного времени [167, с. 6-600]. Для подтверждения данного утверждения нами было решено провести собственный анализ на примере семян *Ch. recutita* и заморозить их в жидком азоте с различной длительностью (1 сутки, 7 суток и 6 месяцев). Это помогло бы нам убедиться, что семена данной культуры ведут себя аналогично и соответствуют уже известным данным. Также некоторые положительные или отрицательные эффекты могут быть видны только после более длительного времени хранения семян при сверхнизких температурах. Таким образом, анализ по длительности хранения позволяет создать долгосрочные данные и потенциально обнаружить более тонкие эффекты, которые могли быть не учтены при кратковременном хранении семян в жидком азоте. в короткосрочных исследованиях.

Объектами исследования являлись семена *Ch. recutita* 4-х сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Семена данных сортов в криопробирках погружали непосредственно в жидкий азот. Криозащитные растворы не применялись. Время экспозиции составляла 24 часа, 1 неделя и 6 месяцев. После криоконсервации семена размораживали при комнатной температуре до полного оттаивания. Всхожесть семян оценивали согласно методическим рекомендациям Зориной и Кабанова [209, с. 75-84]. После оттаивания семена проращивали в чашках Петри в количестве 100 штук в четырехкратной повторности на двухслойной фильтровальной бумаге, предварительно смоченной дистиллированной водой. Семенной материал в чашках Петри проращивали в климатической камере при температуре +25°C с постоянным освещением.

Анализ жизнеспособности семян *Ch. recutita* сорта «Карагандинская» показал, что всхожесть достоверно повышается при длительном хранении семян в жидком азоте (рисунок 33). Максимальная всхожесть семян была зафиксирована после шестимесячного хранения в условиях жидкого азота и составила 84%, а энергия прорастания 83%. Эти показатели значительно превосходят контрольные результаты, где всхожесть составила 70%, а энергия прорастания – 67%.

Минимальные показатели всхожести были получены при криоконсервации в течение 1 суток и составили 62%, энергия прорастания 56%. При хранении семян в течение 7 суток всхожесть составила 72%, а энергия прорастания 68%.

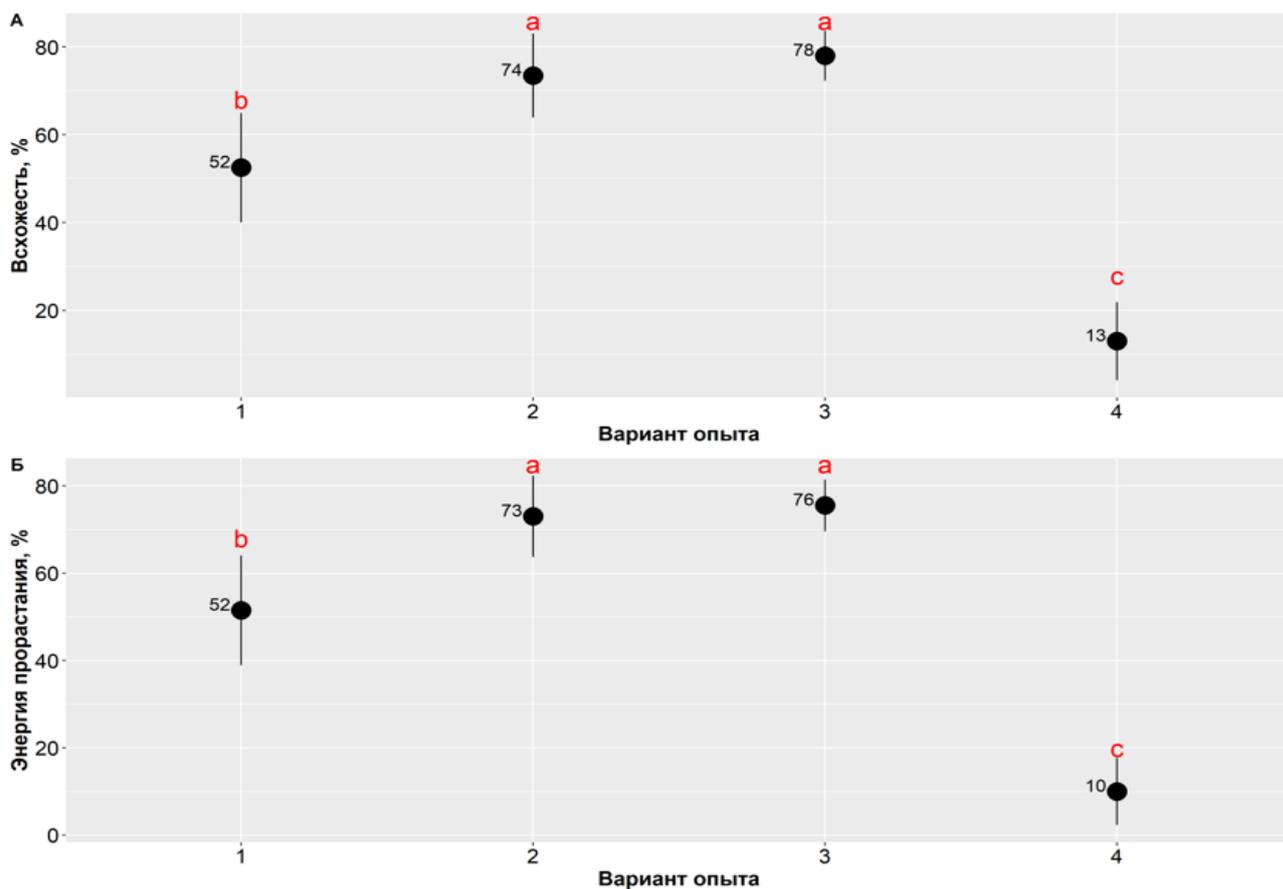


1 - контроль; 2 – криоконсервация 1 суток; 3 – криоконсервация 7 суток; 4 – криоконсервация длительностью 6 месяцев

Рисунок 33 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криоконсервации с различной длительностью

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Результаты исследования по сорту «Подмосковная» были следующими. Всхожесть и энергии прорастания семян контрольной группы были идентичными и составили 52% (рисунок 34). Максимальная всхожесть и энергия прорастания были получены в варианте при криоконсервации в течение 7 суток и составили 78% и 76% соответственно. Незначительно ниже результаты были получены при криоконсервации длительностью 1 сутки. Так, всхожесть в данном варианте опыта составила 74%, а энергия прорастания 73%. Достоверно низкие результаты по всхожести были зафиксированы в варианте опыта при криоконсервации длительностью 6 месяцев и составили всего 13%, а энергия прорастания 10%.

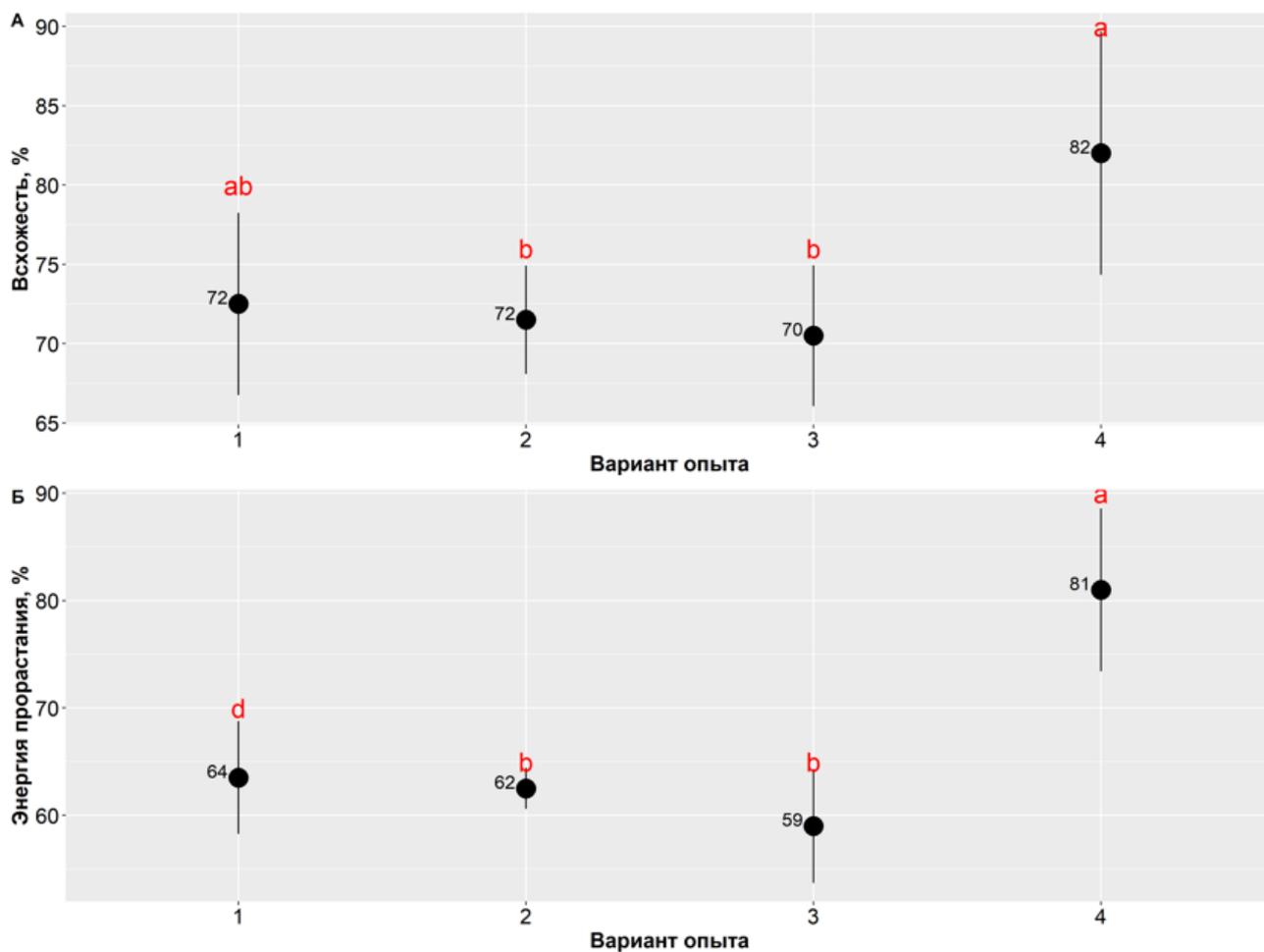


1 - контроль; 2 – криоконсервация 1 сутки; 3 – криоконсервация 7 суток; 4 – криоконсервация длительностью 6 месяцев

Рисунок 34 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криоконсервации с различной длительностью

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Результаты исследования жизнеспособности семян сорта «Айболит» показали повышение всхожести при длительном хранении в жидком азоте (рисунок 35). Так, всхожесть семян при криоконсервации длительностью 1 сутки составила 72%, энергия прорастания 62%, 7 суток 70 и 59%, 6-ть месяцев 82% и энергия прорастания 81%. Всхожесть семян контрольной группы 72%, энергия прорастания 64%.

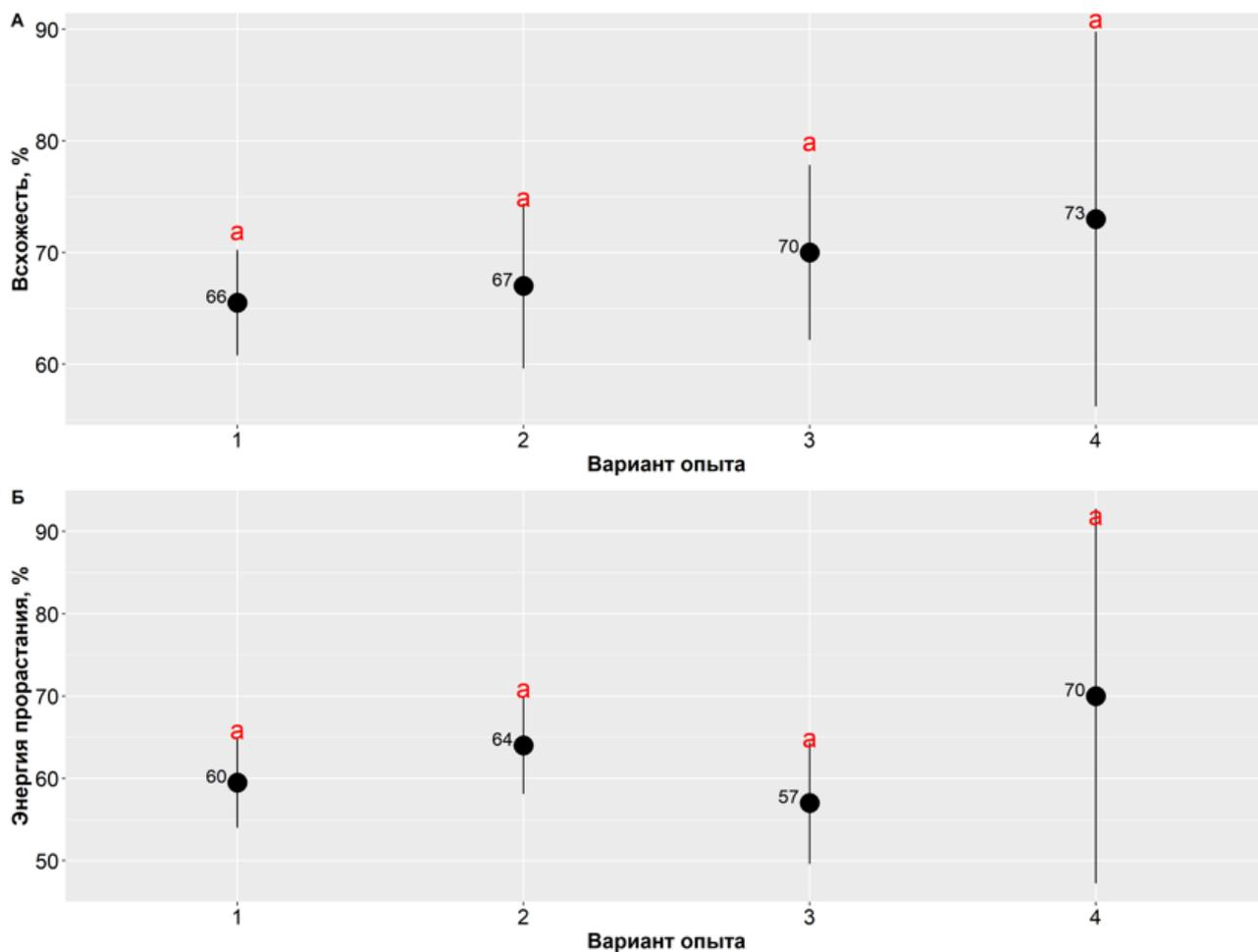


1 - контроль; 2 – криоконсервация 1 сутки; 3 – криоконсервация 7 суток; 4 – криоконсервация длительностью 6 месяцев

Рисунок 35 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Айболит» после криоконсервации с различной длительностью

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Жизнеспособность семян сорта «Старый лекарь» также повышается при длительном хранении в жидком азоте (рисунок 36). Всхожесть семян данного сорта при криоконсервации длительностью 1 сутки составила 67%, энергия прорастания 64%, при 7 дневном хранении - 70% и энергия прорастания 57%, при шестимесячной криоконсервации всхожесть составила 73% и энергия прорастания 70%. Всхожесть семян контрольной группы составила 66%, энергия прорастания 60%.



1 - контроль; 2 – криоконсервация 1 сутки; 3 – криоконсервация 7 суток; 4 – криоконсервация длительностью 6 месяцев

Рисунок 36 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь» после криоконсервации с различной длительностью

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Таким образом, можно сделать вывод, что длительность хранения семян *Ch. recutita* в жидком азоте все же влияет на их жизнеспособность. Так, более длительная криоконсервация положительно сказалась на всхожести семян сортов «Старый лекарь», «Айболит» и «Карагандинская». Семена сорта «Подмосковная» положительно отреагировали на кратковременное хранение в жидком азоте, а при длительном наблюдается резкое снижение всхожести и энергии прорастания семян.

#### 4.9 Изучение влияния криопротекторов на жизнеспособности семян сортов семян *Chamomilla recutita* при хранении в жидком азоте

Основной риск при криоконсервации биологических материалов представляют собой образующиеся кристаллы льда, которые механически повреждают клеточные мембраны. При замораживании удаляется вода из клеток, что приводит к концентрированию солей и денатурации белков. В связи

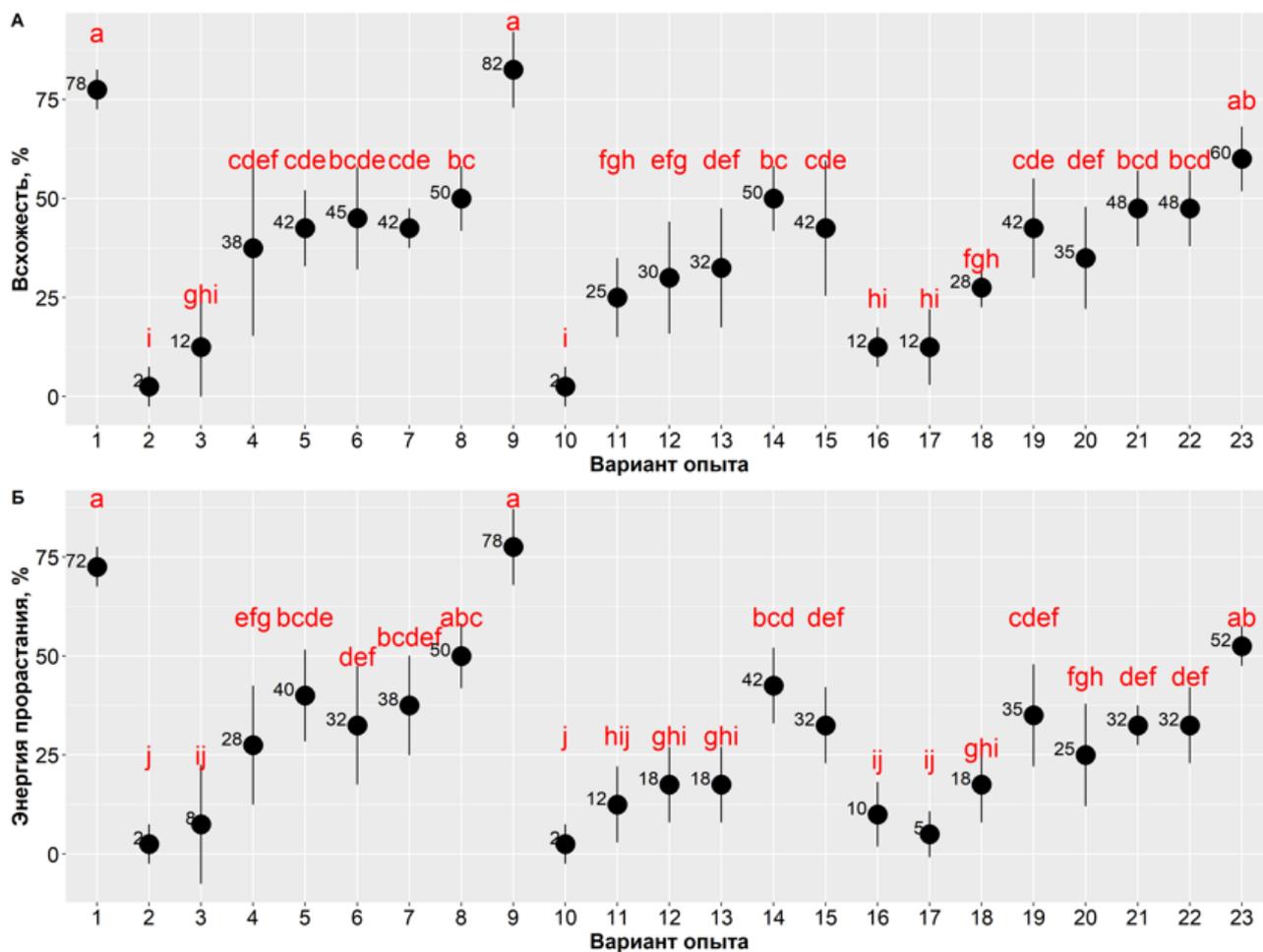
с этим ключевым аспектом криоконсервации является использование криопротекторов, которые защищают клетки от повреждений, вызванных сверхнизкими температурами. Криопротекторы уменьшают точку замерзания воды в клетках и повышают ее вязкость, замедляя кристаллизацию. При этом вода переходит в аморфное, стеклообразное состояние, которое минимизирует повреждение структур клетки. Следует отметить, что использование криопротекторов имеет свои ограничения. Например, некоторые вещества могут проявлять токсические действия, а некоторые могут быть безопасными для клеток при высоких концентрациях, поэтому важно оптимизировать условия криоконсервации при использовании криопротекторов. Современные исследования направлены на разработку новых криопротекторных веществ с улучшенными свойствами, например, с меньшей токсичностью и более высокой эффективностью при низких концентрациях [188, с. 22-34; 225, 226]. По механизму действия криопротекторы подразделяются на проникающие и непроникающие. Проникающие криопротекторы – вещества способные проникать внутрь клетки и предотвращать образование кристаллов льды за счет связывание ионов водорода. К ним относятся диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин и пропиленгликоль. Непроникающие криопротекторы остаются вне клетки и предотвращают ее от обезвоживания. К ним относятся сахара – сахароза, фруктоза, глюкоза [227-229].

В связи с выше изложенным, нами при криоконсервации семян *Ch. recutita* были использованы два вида криопротекторов по механизмам действия, это непроникающие сахароза, фруктоза, глюкоза и проникающие ДМСО и пропиленгликоль. Выбор данных криопротекторов обусловлен их широким применением при криоконсервации семян различных видов растений. В качестве объекта исследования были использованы семена 4-х сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Семена данных сортов предварительно были обработаны криопротекторами в течение 1-го часа в пластиковых криопробирках, затем погружены в сосуд Дюара с жидким азотом (рисунок 37). После криозамораживания семена были разморожены при комнатной температуре до полного оттаивания и ставились на проращивание в чашках Петри для определения их жизнеспособности.



Рисунок 37 – Изучение влияния криопротекторов при криоконсервации семян сортов *Chamomilla recutita*

Результаты исследования показали, что семена сорта «Карагандинская» лучше всего отреагировали на высококонцентрированные непроникающие криопротекторы (рисунок 38). Так, максимальная всхожесть была при обработке 40%-й сахарозой и составила 82%, что на 4% выше показателя контроля (всхожесть 78%). При обработке семян 40% глюкозой всхожесть составила 60%. Низкая всхожесть семян была при обработке 35%-й сахарозой и 25%-й фруктозой, и составила по 50%. Практически все низкоконцентрированные криопротекторы отрицательно повлияли на всхожесть семян, так как их значения были ниже 50%, а иногда и на уровне 2%.

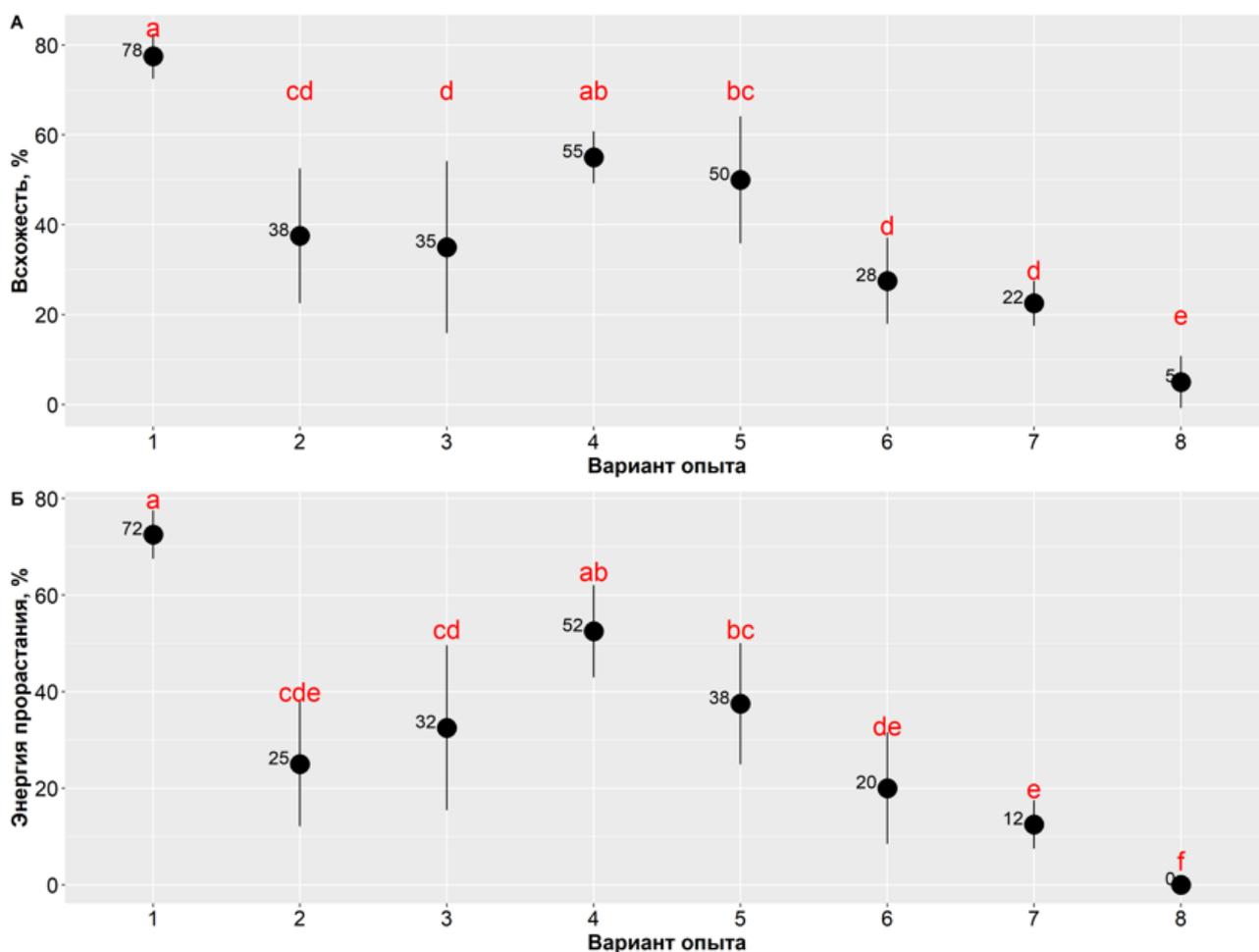


1 - контроль; 2 – концентрация сахарозы 5%; 3 - концентрация сахарозы 10%; 4 - концентрация сахарозы 15%; 5 - концентрация сахарозы 20%; 6 - концентрация сахарозы 25%; 7 - концентрация сахарозы 30%; 8 - концентрация сахарозы 35%; 9 - концентрация сахарозы 40%; 10 – концентрация фруктозы 5%; 11 - концентрация фруктозы 10%; 12 - концентрация фруктозы 15%; 13 - концентрация фруктозы 20%; 14 - концентрация фруктозы 25%; 15 - концентрация фруктозы 30%; 16 – концентрация глюкозы 5%; 17 - концентрация глюкозы 10%; 18 - концентрация глюкозы 15%; 19 - концентрация глюкозы 20%; 20 - концентрация глюкозы 25%; 21 - концентрация глюкозы 30%; 22 - концентрация глюкозы 35%; 23 - концентрация глюкозы 40%

Рисунок 38 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криоконсервации с применением непроникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

При обработке проникающими криопротекторами семена сорта «Карагандинская» лучше всего отреагировали на высококонцентрированный ДМСО (15%) и низкоконцентрированный пропиленгликоль (5%), всхожесть в данных вариантах составила 55 и 50% соответственно (рисунок 39).

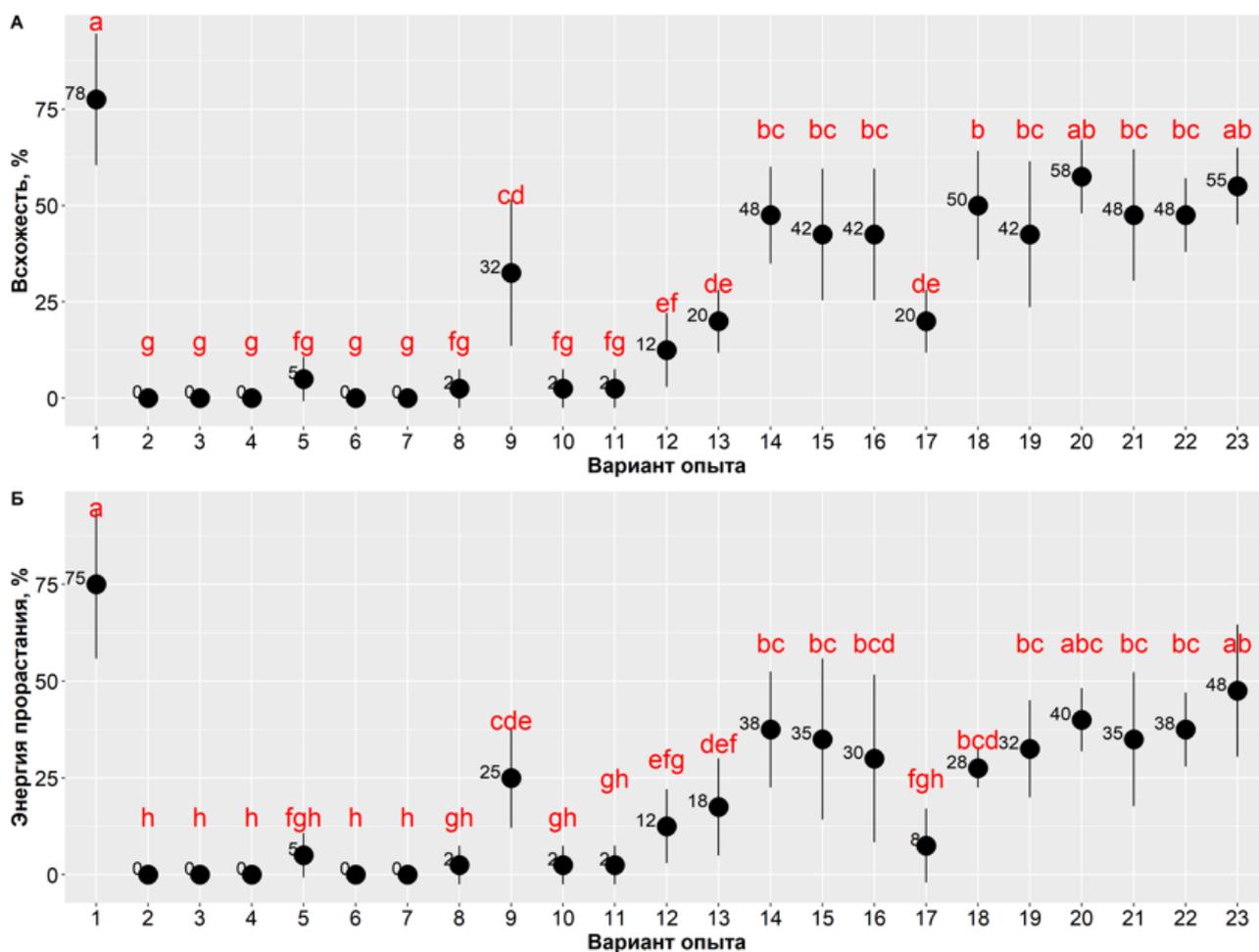


1 – контроль; 2 - ДМСО 5%; 3 - ДМСО 10%; 4 - ДМСО 15%; 5 - пропиленгликоль 5%; 6 - пропиленгликоль 10%; 7 - пропиленгликоль 15%; 8 - пропиленгликоль 20%

Рисунок 39 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криоконсервации с применением проникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

При обработке непроникающими криопротекторами семена сорта «Подмосковная» лучше всего отреагировали на глюкозу (рисунок 40). Так, максимальные значения всхожести были зафиксированы при обработке 25%-й глюкозой. В данном варианте опыта всхожесть составила 58%. Чуть меньше показатели всхожести были при обработке 40%-й глюкозой и составили 55%. 50%-я всхожесть была показана при использовании 15%-й глюкозы. Также стоит отметить, что семена хорошо отреагировали на использование высококонцентрированной фруктозы (концентрации 25 и 30%) и сахарозы (концентрация 40%). В данных концентрациях всхожесть хоть и была низкая (48, 42 и 32%) однако они все же выше показателей низких концентраций, которые практически были нулевыми.

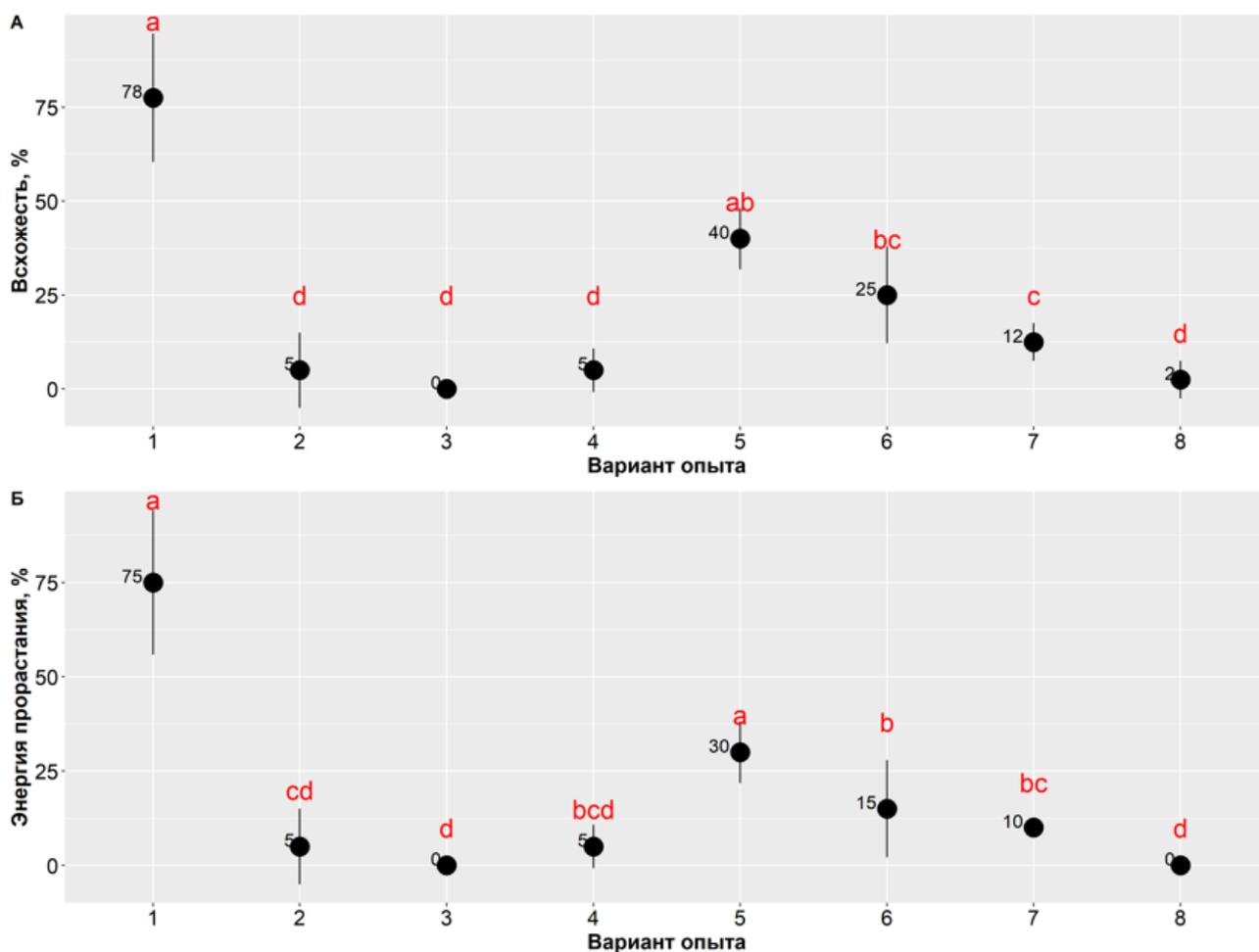


1 - контроль; 2 – концентрация сахарозы 5%; 3 - концентрация сахарозы 10%; 4 - концентрация сахарозы 15%; 5 - концентрация сахарозы 20%; 6 - концентрация сахарозы 25%; 7 - концентрация сахарозы 30%; 8 - концентрация сахарозы 35%; 9 - концентрация сахарозы 40%; 10 – концентрация фруктозы 5%; 11 - концентрация фруктозы 10%; 12 - концентрация фруктозы 15%; 13 - концентрация фруктозы 20%; 14 - концентрация фруктозы 25%; 15 - концентрация фруктозы 30%; 16 – концентрация глюкозы 5%; 17 - концентрация глюкозы 10%; 18 - концентрация глюкозы 15%; 19 - концентрация глюкозы 20%; 20 - концентрация глюкозы 25%; 21 - концентрация глюкозы 30%; 22 - концентрация глюкозы 35%; 23 - концентрация глюкозы 40%

Рисунок 40 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криоконсервации с применением непроникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Проникающие криопротекторы, применяемые при криоконсервации, оказали негативное влияние на всхожесть семян сорта «Подмосковная» (рисунок 41). Лишь 5%-й пропиленгликоль смог повысить всхожесть до 40%, а остальные варианты показали очень низкие значения.

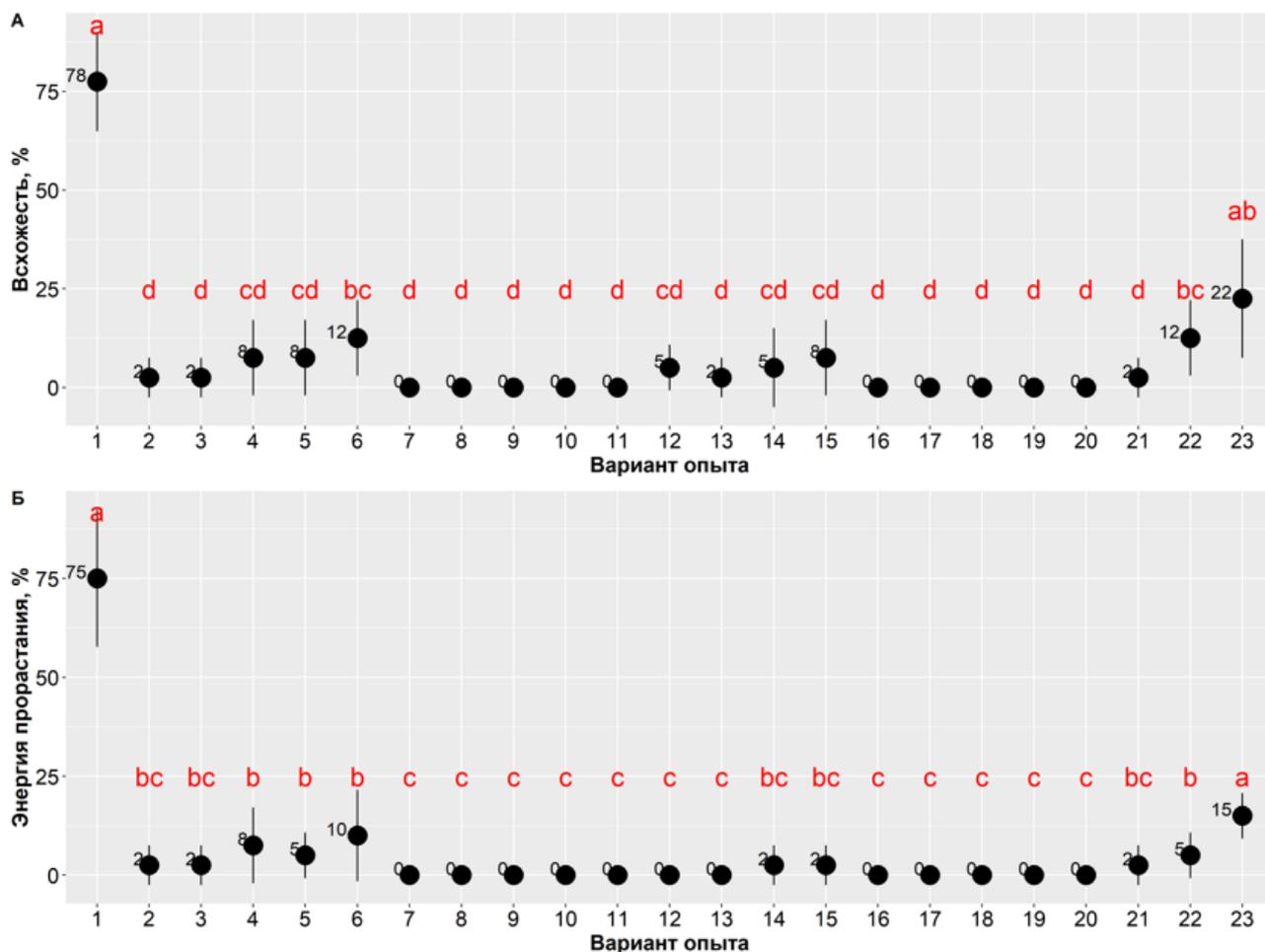


1 – контроль; 2 - ДМСО 5%; 3 - ДМСО 10%; 4 - ДМСО 15%; 5 - пропиленгликоль 5%; 6 - пропиленгликоль 10%; 7 - пропиленгликоль 15%; 8 - пропиленгликоль 20%

Рисунок 41 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криоконсервации с применением проникающих крипротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

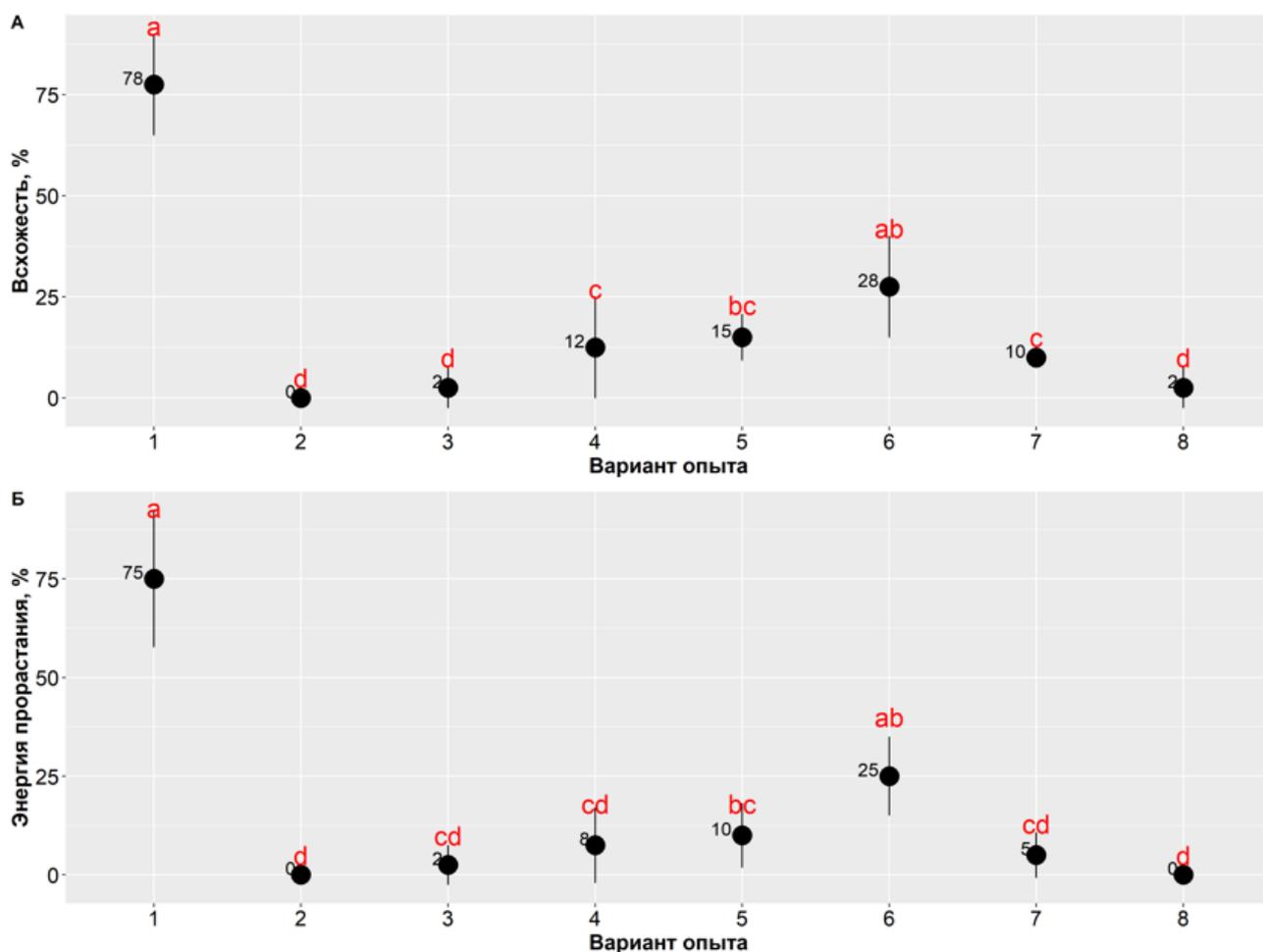
Семена сорта «Айболит» очень плохо отреагировали на обработку как непроникающими, так и проникающими крипротекторами. Всхожесть семян как видно на рисунках 42, 43 была практически нулевая во всех вариантах опыта, особенно при обработке непроникающими крипротекторами. Лишь незначительное повышение до 28% всхожести можно наблюдать при использовании 10%-го пропиленгликоля и до 22% при использовании 40%-ой глюкозы. Однако данные показатели достоверно ниже значения контроля.



1 - контроль; 2 – концентрация сахарозы 5%; 3 - концентрация сахарозы 10%; 4 - концентрация сахарозы 15%; 5 - концентрация сахарозы 20%; 6 - концентрация сахарозы 25%; 7 - концентрация сахарозы 30%; 8 - концентрация сахарозы 35%; 9 - концентрация сахарозы 40%; 10 – концентрация фруктозы 5%; 11 - концентрация фруктозы 10%; 12 - концентрация фруктозы 15%; 13 - концентрация фруктозы 20%; 14 - концентрация фруктозы 25%; 15 - концентрация фруктозы 30%; 16 – концентрация глюкозы 5%; 17 - концентрация глюкозы 10%; 18 - концентрация глюкозы 15%; 19 - концентрация глюкозы 20%; 20 - концентрация глюкозы 25%; 21 - концентрация глюкозы 30%; 22 - концентрация глюкозы 35%; 23 - концентрация глюкозы 40%

Рисунок 42 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Айболит» после криоконсервации с применением непроникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

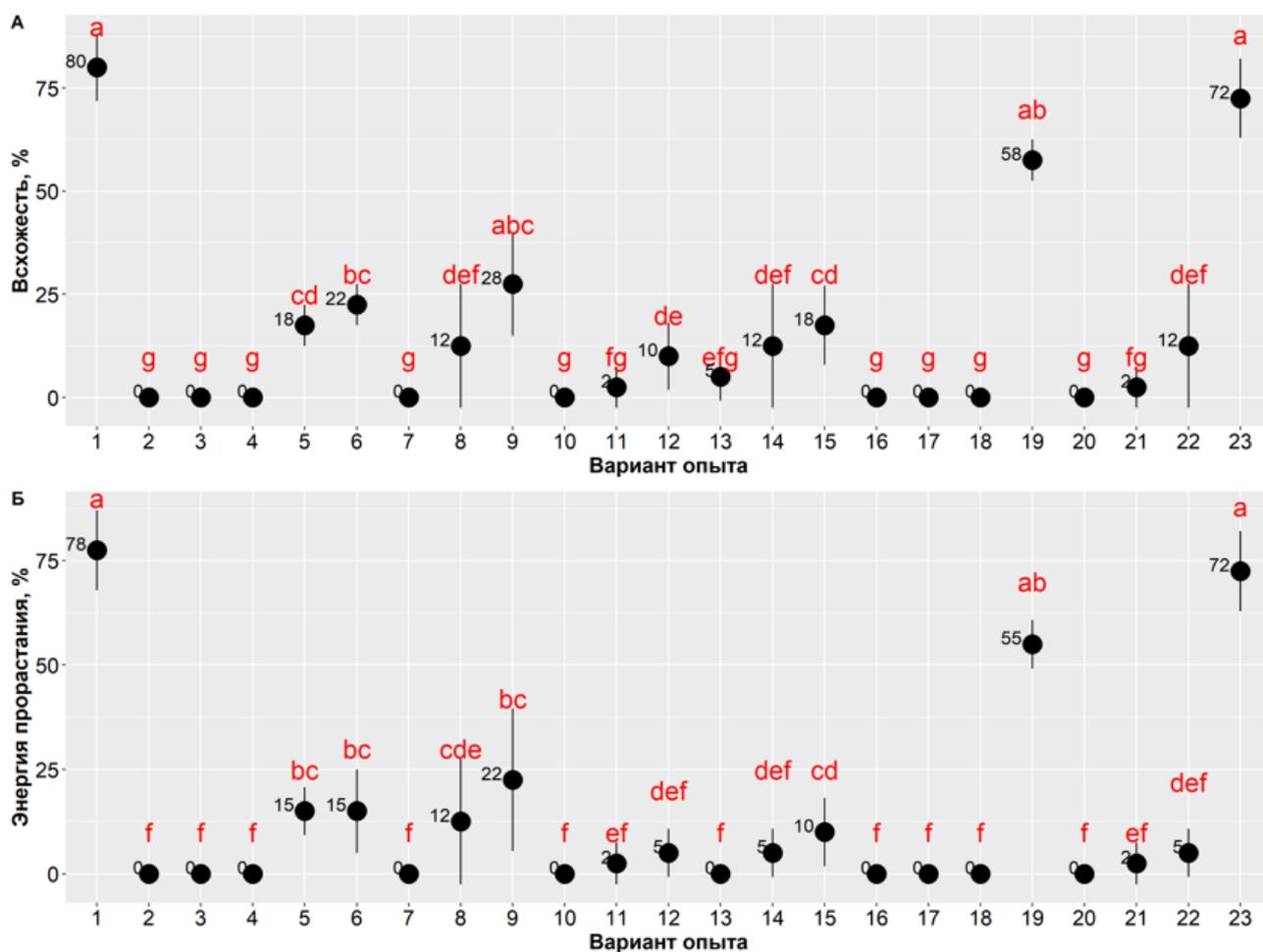


1 – контроль; 2 - ДМСО 5%; 3 - ДМСО 10%; 4 - ДМСО 15%; 5 - пропиленгликоль 5%; 6 - пропиленгликоль 10%; 7 - пропиленгликоль 15%; 8 - пропиленгликоль 20%

Рисунок 43 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Айболит» после криоконсервации с применением проникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Семена сорта «Старый лекарь» положительно отреагировали на обработку семян высококонцентрированной глюкозой (40%). Всхожесть в данном варианте была максимальной и составила 72%. При обработке 20%-й глюкозой всхожесть была на уровне 58%. Использование таких криопротекторов, как сахароза и фруктоза оказалось не целесообразной, так как всхожесть при их использовании значительно понижается (рисунок 44).

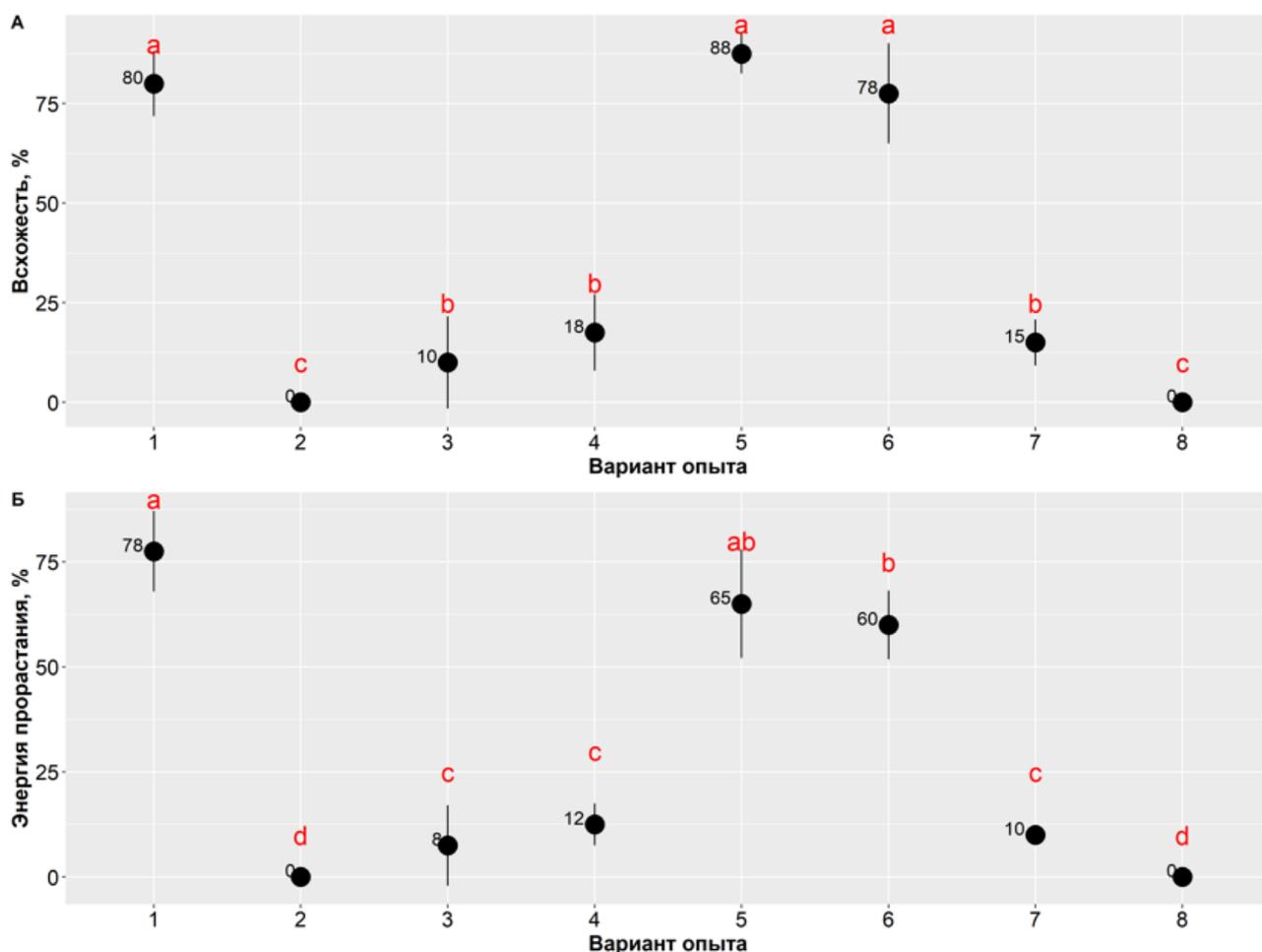


1 - контроль; 2 – концентрация сахарозы 5%; 3 - концентрация сахарозы 10%; 4 - концентрация сахарозы 15%; 5 - концентрация сахарозы 20%; 6 - концентрация сахарозы 25%; 7 - концентрация сахарозы 30%; 8 - концентрация сахарозы 35%; 9 - концентрация сахарозы 40%; 10 – концентрация фруктозы 5%; 11 - концентрация фруктозы 10%; 12 - концентрация фруктозы 15%; 13 - концентрация фруктозы 20%; 14 - концентрация фруктозы 25%; 15 - концентрация фруктозы 30%; 16 – концентрация глюкозы 5%; 17 - концентрация глюкозы 10%; 18 - концентрация глюкозы 15%; 19 - концентрация глюкозы 20%; 20 - концентрация глюкозы 25%; 21 - концентрация глюкозы 30%; 22 - концентрация глюкозы 35%; 23 - концентрация глюкозы 40%

Рисунок 44 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь» после криоконсервации с применением непроникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Оптимальным проникающим криопротектором является 5%-й и 10%-пропиленгликоль, т.е. низкие концентрации. При использовании пропиленгликоля в данных концентрациях всхожесть составила 88 и 78% соответственно. ДМСО, как проникающий криопротектор не рекомендуется к использованию при криоконсервации семян данного сорта, так как всхожесть была минимальной (рисунок 45).



1 – контроль; 2 - ДМСО 5%; 3 - ДМСО 10%; 4 - ДМСО 15%; 5 - пропиленгликоль 5%; 6 - пропиленгликоль 10%; 7 - пропиленгликоль 15%; 8 - пропиленгликоль 20%

Рисунок 45 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь» после криоконсервации с применением проникающих криопротекторов

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Таким образом, при криоконсервации семян *Ch. recutita* сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» рекомендуется использовать высококонцентрированные непроникающие криопротекторы, в качестве проникающих 15%-й ДМСО и низкоконцентрированный пропиленгликоль (5%).

#### 4.10 Комплексная оценка влияния криоконсервации с использованием криопротектора PVS2 на жизнеспособность семян, морфометрию и водный баланс проростков *Chamomilla recutita*

В некоторых случаях для наиболее оптимальной защиты клеток при замораживании применяются смеси криопротекторов, которые сочетают проникающие и непроникающие вещества. Это позволяет снизить токсичность каждого компонента и повысить эффективность заморозки. К таким

криопротекторным растворам относятся PVS2 (Plant vitrification solution) – 30% глицерин + 15% этиленгликоль + 15% ДМСО + 0,4М сахара [178, p. 151-171].

В данном исследовании перед нами стояла цель оптимизировать условие криоконсервации семян *Ch. recutita* с предварительной обработкой криопротекторным раствором PVS2. Объектом исследования являлись семена сортов «Подмосковная» и «Карагандинская». Криоконсервацию проводили путем прямого погружения семян в пластиковые криопробирках в сосуды Дюара с жидким азотом (-196°C) с различной экспозицией (30 минут, 60 минут и 3 часа). Перед погружением в жидкий азот семена в течение 60 минут находились в растворе PVS2 при температуре +5°C. Результативность криохранения семенного материала *Ch. recutita* определяли по лабораторной всхожести и энергии прорастания. Дополнительно проводился анализ морфометрических характеристик проростков, который осуществлялся с использованием электронного штангенциркуля. Целью морфометрических измерений являлась количественная оценка роста и развития проростков, как показателя их физиологического состояния после криоконсервации. Для определения сухой массы проростки высушивались в термостате при 40°C до постоянной массы, после чего проводилось взвешивание на аналитических весах фирмы Shimadzu. Процентное содержание воды в проростках рассчитывали по формуле:

$$W = \frac{(m - m1)}{m} \times 100;$$

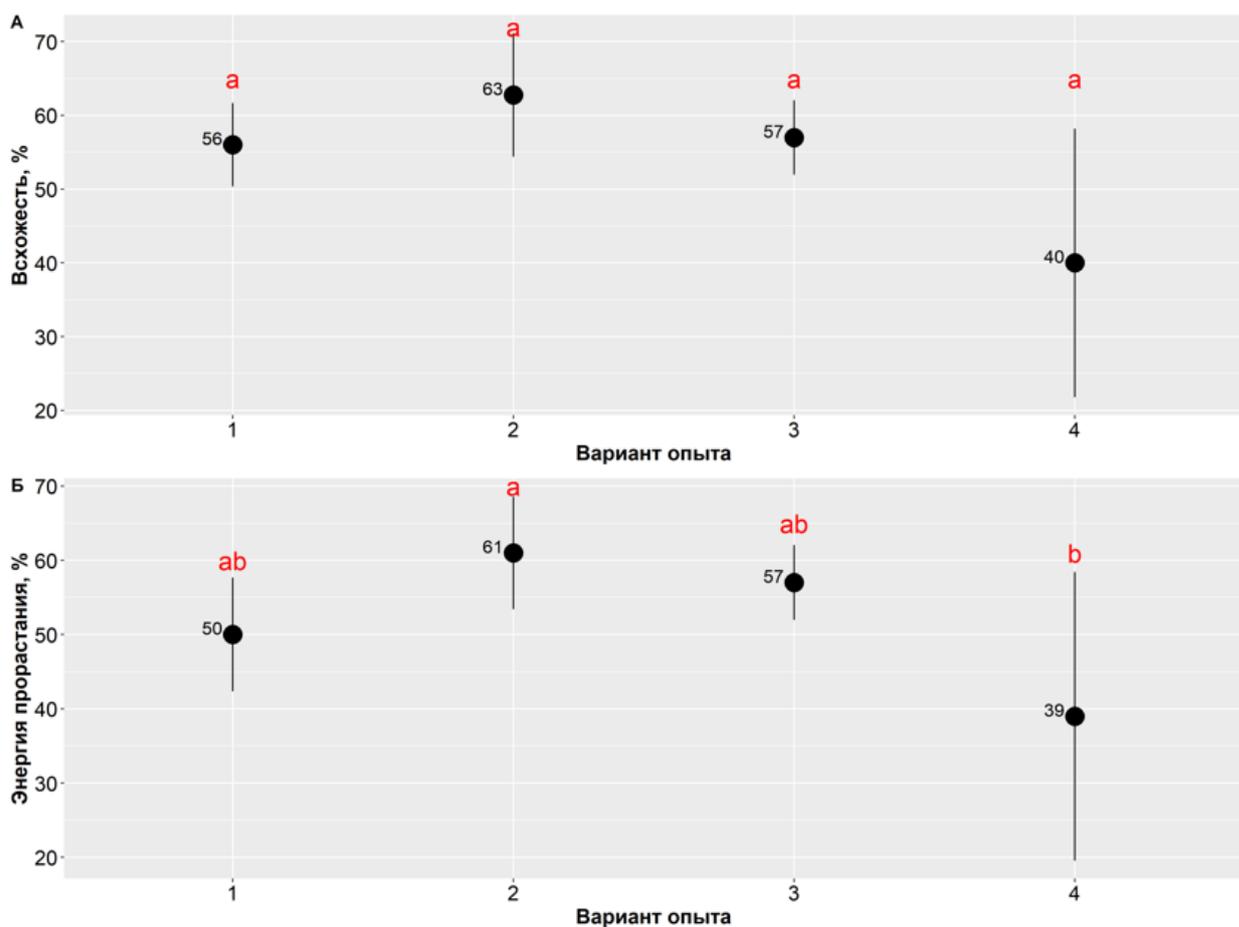
где:

m – масса до высушивания, г.

m1 – масса после высушивания, г.

Определение водного содержания было направлено на выявление возможных нарушений водного обмена, возникающих в результате криогенного воздействия. Этот показатель служит важным критерием оценки метаболической активности проростков и позволяет более полно охарактеризовать их посткриогенное состояние.

Результаты лабораторной всхожести семян сорта «Подмосковная» были следующими. При обработке семян раствором PVS2 лучший результат показал вариант с 30 минутной криоконсервацией (рисунок 46). Всхожесть в данном варианте составила 63%, а энергия прорастания 61%, что выше значений контроля и других вариантов с раствором PVS2. 60-ти минутная криоконсервация с PVS2 показала средние значения по всхожести и составила 57%. Минимальную всхожесть показала 3-х часовая криоконсервация с использованием PVS2 и составила 40%, что ниже контрольных значений на 16%, а энергия прорастания ниже на 11%.

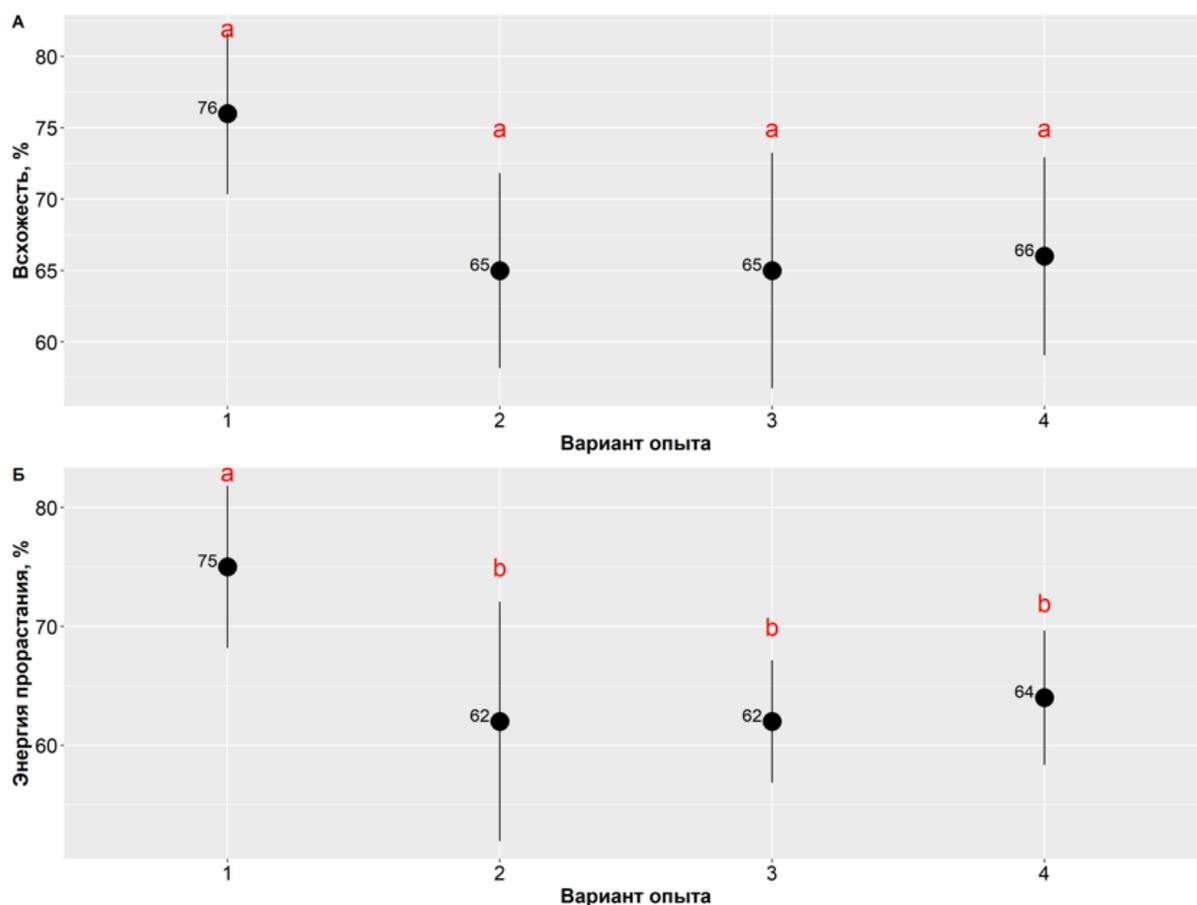


1 – контроль; 2 - криоконсервация длительностью 30 минут; 3 - криоконсервация длительностью 60 минут; 4 - криоконсервация длительностью 3 часа

Рисунок 46 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криоконсервации с применением криопротектора PVS2

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Семена сорта «Карагандинская» на обработку криопротекторным раствором PVS2 отреагировали неплохо, даже можно сказать стабильно, так как результаты всхожести были одинаковые в опытных группах вне зависимости от длительности криоконсервации. Так всхожесть в данных группах составила 65, 65 и 66%. Показатели оказались ниже контрольных значений, но значимых различий нет (рисунок 47).



1 – контроль; 2 - криоконсервация длительностью 30 минут; 3 - криоконсервация длительностью 60 минут; 4 - криоконсервация длительностью 3 часа

Рисунок 47 – Всхожесть и энергия прорастания семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криоконсервации с применением криопротектора PVS2

Примечание – Разные буквы указывают на статистически значимые различия по вариантам опыта

Таким образом, семена вышеуказанных сортов положительно отреагировали на обработку криопротекторным раствором PVS2 вне зависимости от длительности хранения в жидком азоте. Хотя показатели всхожести были невысокими, но данные значение выше 50%, что является неплохим результатом.

Результаты морфометрических показателей проростков *Ch. recutita* были следующими. У проростков сорта «Карагандинская» в контрольном варианте средняя длина листа составляла  $2,4 \pm 0,3$  мм, ширина листа  $1,4 \pm 0,1$  мм, высота гипокотилия  $4,3 \pm 1,6$  мм, длина корня  $54,2 \pm 10,9$  мм (рисунок 48). После 30-минутной криоконсервации с PVS2 наблюдалось снижение длины листа до  $2,3 \pm 0,2$  мм и стабильное значения ширины ( $1,4 \pm 0,2$  мм). Гипокотиль имел высоту  $4,2 \pm 0,7$  мм, а длина корня уменьшилась до  $50,5 \pm 11,1$  мм по сравнению с контролем. При 60-минутной экспозиции с PVS2 длина и ширина листа оставались на уровне  $2,4 \pm 0,2$  мм и  $1,4 \pm 0,2$  мм соответственно, однако высота гипокотилия увеличилась до  $4,8 \pm 0,3$  мм, а длина корня составила  $49,6 \pm 6,1$  мм.

Трехчасовая обработка с PVS2 не повлияла на длину листа ( $2,4\pm 0,3$  мм), ширина незначительно возрасла до  $1,5\pm 0,1$  мм, гипокотиль увеличился до  $5,0\pm 1,1$  мм, а длина корня  $52,3\pm 7,7$  мм.

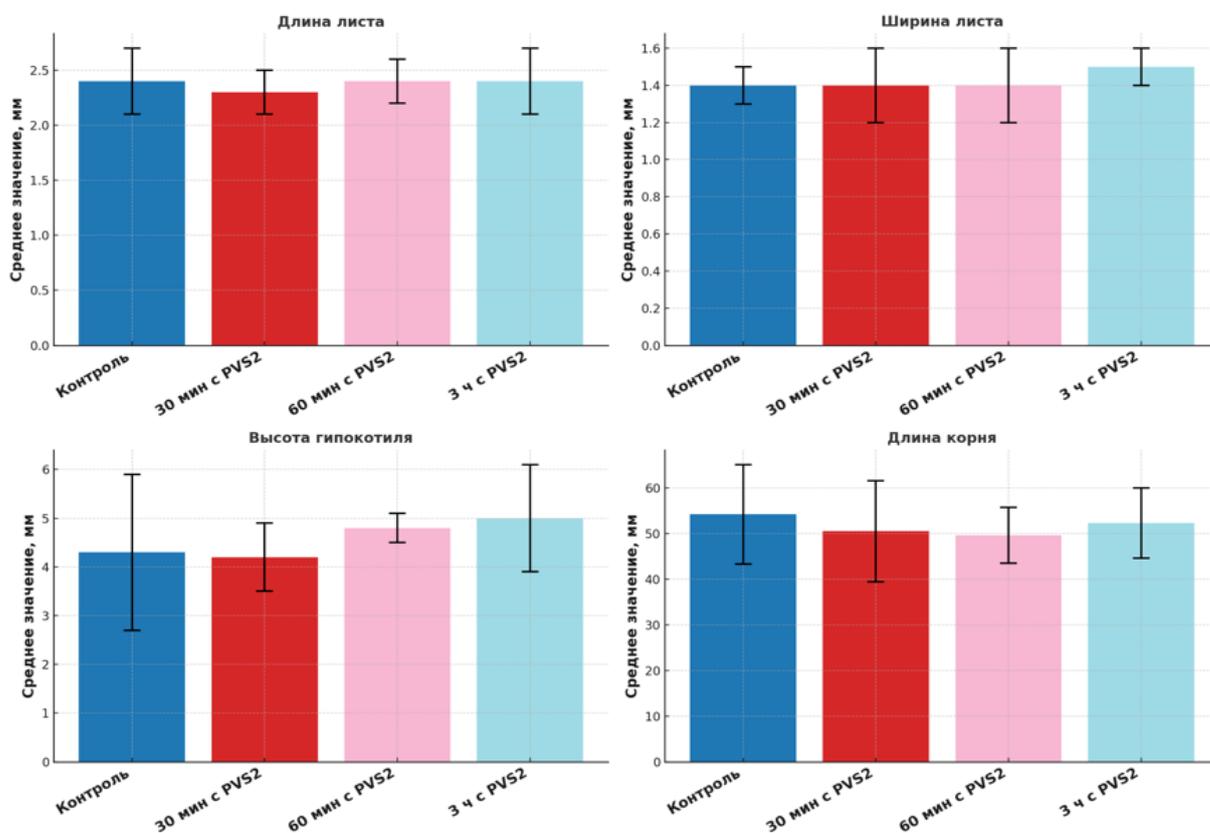


Рисунок 48 – Морфометрические показатели проростков *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криоконсервации с применением криопротектора PVS2

Проростки сорта «Подмосковная» в контрольном варианте характеризовались следующими морфометрическими показателями: длина листа составляла  $1,8\pm 0,3$  мм, ширина листа  $1,1\pm 0,07$  мм, высота гипокотыля  $3,9\pm 0,6$  мм, длина корня  $30,2\pm 3,7$  мм (рисунок 49). При обработке семян раствором PVS2 и последующей криоконсервации в течение 30 минут наблюдалось увеличение длины листа до  $2,2\pm 0,3$  мм и значительное удлинение гипокотыля до  $6,3\pm 1,9$  мм. Ширина листа не изменилась ( $1,1\pm 0,09$  мм), а длина корня была сопоставима с контролем и составила  $30,5\pm 4,8$  мм. Увеличение экспозиции до 60 минут при использовании PVS2 не повлияло на длину и ширину листа ( $2,2\pm 0,1$  мм и  $1,1\pm 0,09$  мм соответственно), но сопровождалось уменьшением высоты гипокотыля до  $5,0\pm 1,2$  мм и увеличением длины корня до  $41,6\pm 10,9$  мм, что является максимальным значением среди всех вариантов сорта «Подмосковная». Трехчасовая криоконсервация сопровождалась незначительным снижением длины листа до  $2,0\pm 0,06$  мм при сохранении ширины ( $1,1\pm 0,06$  мм) и высоких значений гипокотыля ( $6,3\pm 1,5$  мм). Длина корня составила  $36,0\pm 9,9$  мм.

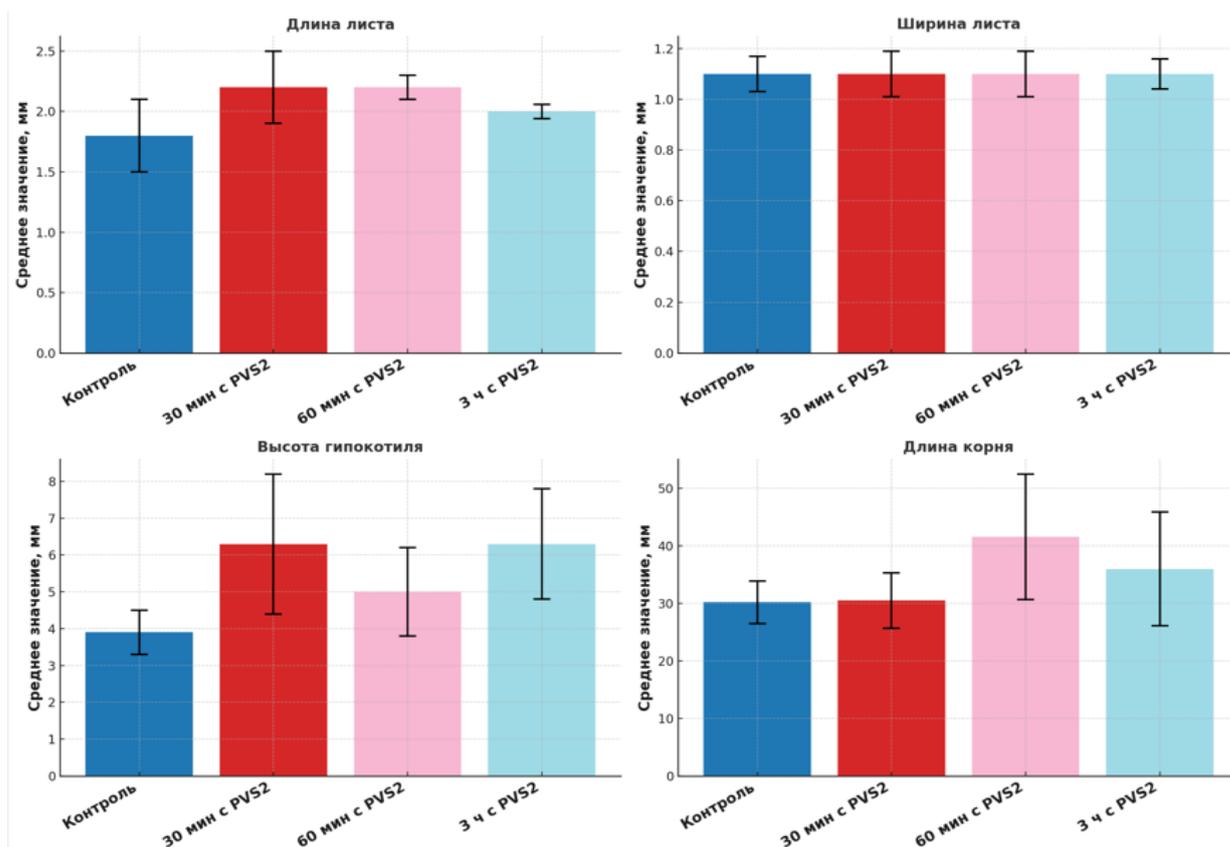
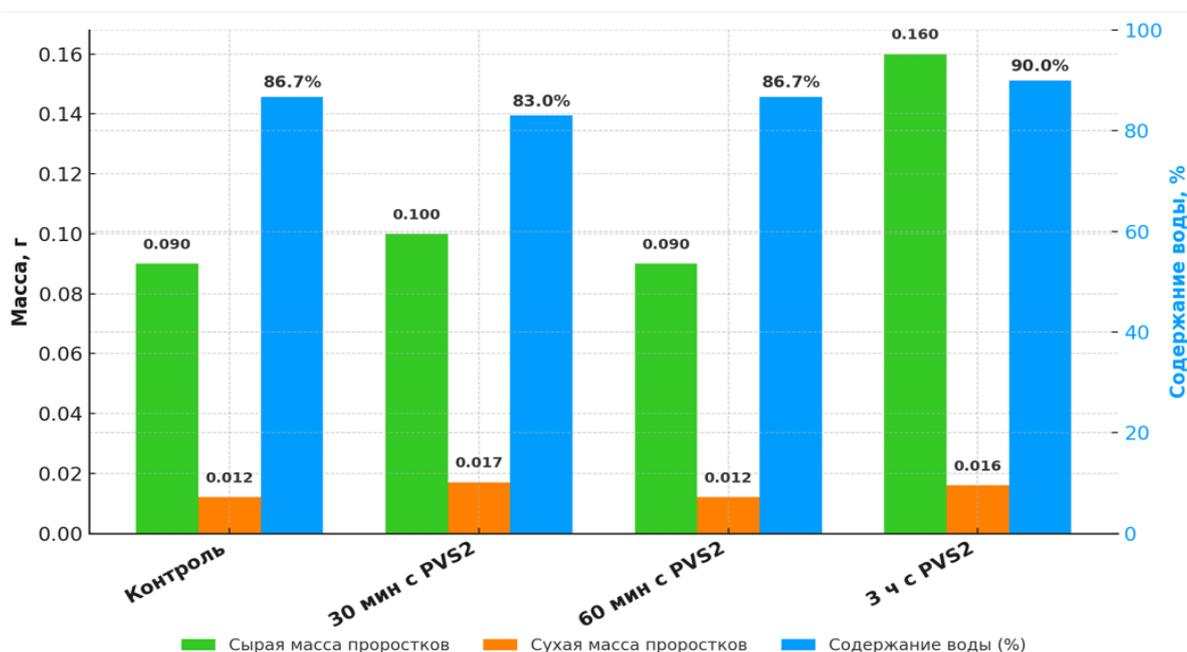


Рисунок 49 – Морфометрические показатели проростков *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криоконсервации с применением криопротектора PVS2

Таким образом, морфометрический анализ показал, что криоконсервация семян *Ch. recutita* оказывает влияние на ростовые показатели проростков, зависящие от условий обработки и сортовой принадлежности. Использование криопротектора PVS2 обеспечивало стабильность морфометрических характеристик и способствовало сохранению роста как у сорта «Карагандинская», так и у сорта «Подмосковная». Сорт «Подмосковная» проявил большую пластичность, а сорт «Карагандинская» устойчивость к криострессу. Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что применение криопротектора PVS2 является эффективной мерой для защиты семян при замораживании в жидком азоте.

Также нами в ходе исследования была проведена оценка водно-массовых характеристик проростков ( $n=25$ ) *Ch. recutita* выше указанных сортов. Так, в контрольном варианте сорта «Карагандинская» сырая масса проростков составила 0,09 г, сухая масса 0,012 г и содержание воды 86,7% (рисунок 50). Аналогичные значения были зафиксированы при 60-минутной криоконсервации с PVS2 (сырая масса 0,09 г, сухая масса 0,012 г и содержание воды 86,7%), что указывает на хорошую сохранность водного баланса тканей при данной экспозиции. При 30-минутной обработке с PVS2 масса проростков незначительно увеличилась до 0,1 г при увеличении сухой массы до 0,017 г, но

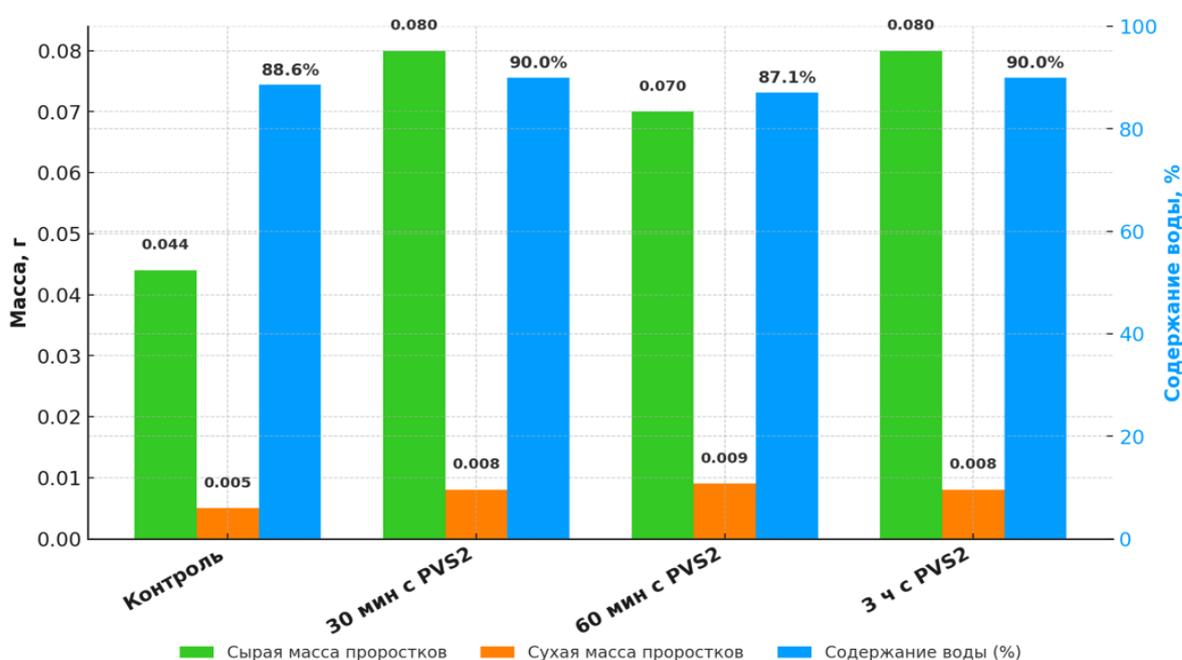
наблюдалось снижение содержание воды до 83,0%. Это может свидетельствовать о частичной дегидратации тканей, связанной с повышенной проницаемостью клеточных оболочек на ранних этапах витрификации. Однако полное восстановление водного баланса наблюдалось при 3-часовой экспозиции, где содержание воды достигло 90,0%, при максимальной сырой массе 0,16 г и сухой массе 0,016 г, что указывает на активацию метаболизма и возможное увеличение объема клеток за счет осмотического притока воды после оттаивания.



(n=25, измерения приведены в граммах и процентах)

Рисунок – 50 Сравнительный анализ массы проростков *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» и содержание воды в них после криоконсервации с PVS2

У сорта «Подмосковная» в контрольных условиях масса проростков была значительно ниже – 0,044 г (сырая масса) и 0,005 г (сухая масса), при содержании воды 88,6% (рисунок 51). После криоконсервации с PVS2 с экспозицией 30 минут сырая масса увеличилась до 0,08 г и сухая до 0,008 г, а содержание воды достигла максимума – 90,0%. При 60-минутной экспозиции масса снизилась до 0,07 г, при этом сухая масса увеличилась до 0,009 г, а содержание воды уменьшилось до 87,1%. Это может быть отражением более выраженного дегидратационного стресса или замедления метаболических процессов. Однако при 3-часовой обработке значения массы вернулись к уровню 30-минутной экспозиции (сырая масса 0,08 г, сухая масса 0,008 г и содержание воды 90,0%), что может указывать на восстановление водного и осмотического гомеостаза при продолжительном пребывании в условиях PVS2, как и у сорта «Карагандинская».



(n=25, измерения приведены в граммах и процентах)

Рисунок – 51 Сравнительный анализ массы проростков *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» и содержание воды в них после криоконсервации с PVS2

Таким образом, оба сорта *Ch. recutita* показали положительную динамику увеличения массы проростков при применении PVS2. Сорт «Карагандинская» характеризуется более высокой стабильностью по водному содержанию и биомассе, особенно при длительной обработке. Сорт «Подмосковная» проявил более выраженный прирост массы на ранней стадии (30 минут), но с колебаниями по содержанию воды при средней экспозиции (60 минут). Эти данные указывают на сортовые различия в реакции на криоконсервацию и потенциал использования PVS2 для оптимизации хранения и последующего восстановления проростков *Ch. recutita*.

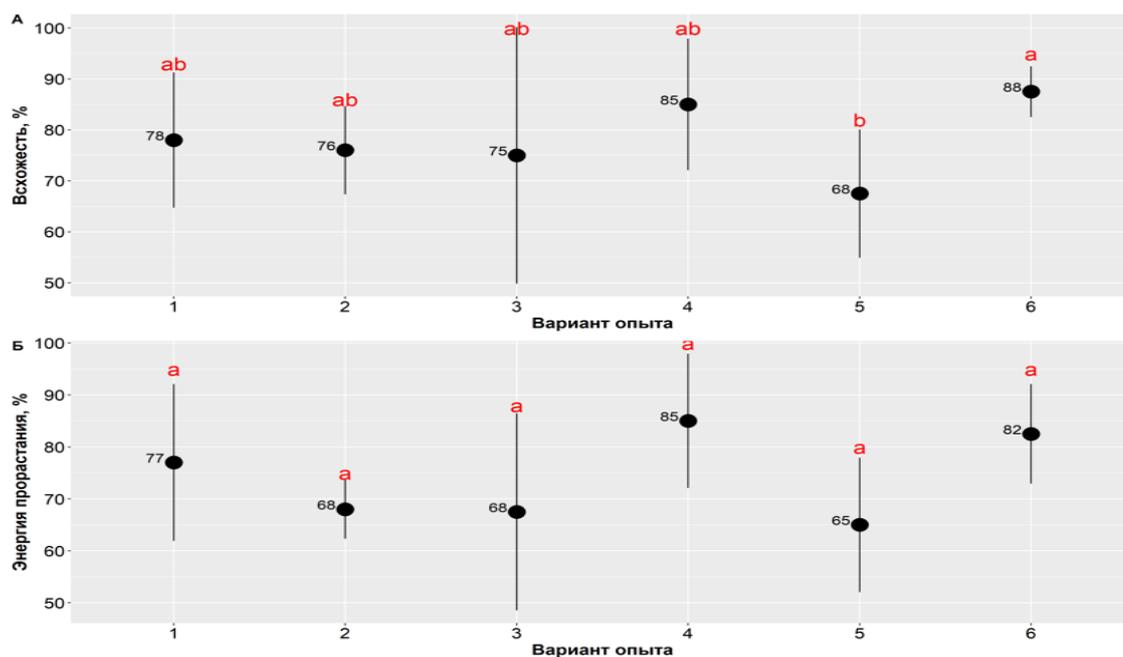
#### 4.11 Изучение влияния физических факторов на всхожесть и энергию прорастания семян сортов *Chamomilla recutita* после криохранения

Для активации прорастания семян применяются несколько методов физического воздействия такие как, скарификация, стратификация, барботирование и действие магнитного поля. Скарификация - представляет из себя процесс механического или химического воздействия на семенную кожуру. Семенная кожура обрабатывается наждачной бумагой или кислотой для утончения кожуры. Данный процесс позволяет быстрому проникновению воды внутрь семени для его прорастания. Стратификация – метод обработки семян действием низких температур непродолжительное время и замачивание в воде для активации физиологических или биохимических процессов в семенах, что приводит к быстрому прорастанию [230, 231]. Барботирование или

насыщение воды кислородом посредством подачи воздуха (аэрация семян), что позволяет улучшить доступ кислорода к их стенкам, увеличивает выработку активных форм кислорода (АФК). АФК играет важную роль в нарушении покоя семян, ослабляя клеточные стенки, облегчая поглощение воды и стимулируя активность ферментов, необходимые для прорастания [232]. Исследования некоторых авторов показали, что семена, обработанные в воде с ультрамелкими пузырьками (УМП), демонстрируют значительно более высокую и быструю скорость прорастания, чем семена, просто замоченные в дистиллированной воде. Данный эффект наблюдался у таких культур, как соя, ячмень, салат где обработка УМП помогла достичь более высокой скорости прорастания [232, р. 1677-1-1677-9; 233, 234]. Воздействие магнитного поля представляет собой метод обработки семян статическим или переменным магнитным полем перед посадкой. Согласно исследованиям, магнитные поля могут влиять на прорастание семян, стимулируя ферментативную активность и рост клеток. Магнитное поле меняет ионный обмен в клетках, улучшая проницаемость мембран, что способствует активизации роста и метаболических процессов [235].

В связи с выше изложенным, нами было решено применить методы предпосевной обработки семян *Ch. recutita*, так как криоконсервация несколько понижало всхожесть семян данной культуры. Было решено после криоконсервации семян использовать барботирование и действие магнитного поля, как наиболее безопасных и простых методов физической активации всхожести. В качестве объекта исследования были использованы семена *Ch. recutita* 4-х сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Барботирование семян данных сортов проводили в течение суток в водной среде с применением погружного насоса в цилиндре. Для действия магнитным полем использовали систему круглых магнитов. Семена обрабатывались магнитным полем в течение суток и трех суток. В качестве контрольной группы служили семена, не подвергавшиеся физическим воздействиям после криоконсервации.

Так, результаты исследования показали, что предобработка семян физическим воздействием положительно сказалось на их всхожести. Отмечено, что действие двойного магнитного поля в течение 3-х суток достоверно повысило всхожесть семян сорта «Карагандинская» на 10% по сравнению с контролем и составило 88% (рисунок 52). Контрольная всхожесть составила 78%. Также повысило всхожесть семян на 7% кратковременное действие двойным магнитным полем в течение суток. Всхожесть в данном случае составила 85%. Кратковременное же действие одинарного магнитного поля не повысило всхожесть семян, но и не понизило, так как всхожесть была на уровне контрольных значений и составила 75%. Длительное воздействие одинарным магнитным полем оказалось не эффективной, так как всхожесть была низкой и составила 68%. Барботирование, как метод физической активации всхожести не была столь эффективной, как 2-е магнитное поле, но и нет его отрицательного действия, так как всхожесть остается на уровне контрольных значений (76%).

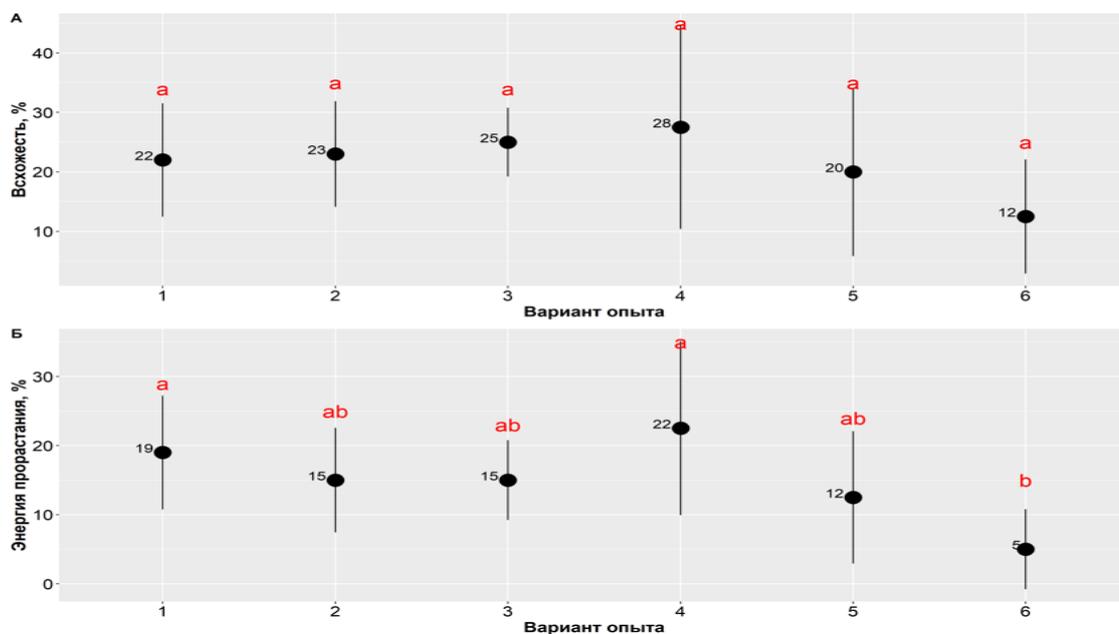


1 – криоконсервация без применения дополнительных физических воздействий (контроль); 2 – обработка методом барботирования; 3 – 1-е магнитное поле в течение 24 часов; 4 – 2-е магнитное поле в течение 24 часов; 5 – 1-е магнитное поле в течение трех суток; 6 – 2-е магнитное поле в течение трех суток

Рисунок 52 – Жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* сорта «Карагандинская» после криохранения с предпосевной обработкой

Примечание – Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами опыта

На семенной материал сорта «Подмосковная» положительное действие оказали кратковременное воздействие одинарным и двойным магнитным полем в течение суток (рисунок 53). Всхожесть при этом составила 25 и 28%, что несколько выше показателей контроля. Также барботирование незначительно повысило всхожесть и показало 23%. Длительное действие магнитного поля в течение трех суток не оказало столь значимого положительного действия по сравнению с кратковременным воздействием. Так, при длительном 1-ом магнитном поле всхожесть оказалось чуть ниже контроля и показала 20%, а при 2-ом магнитном поле вовсе наблюдается снижение до 12%.

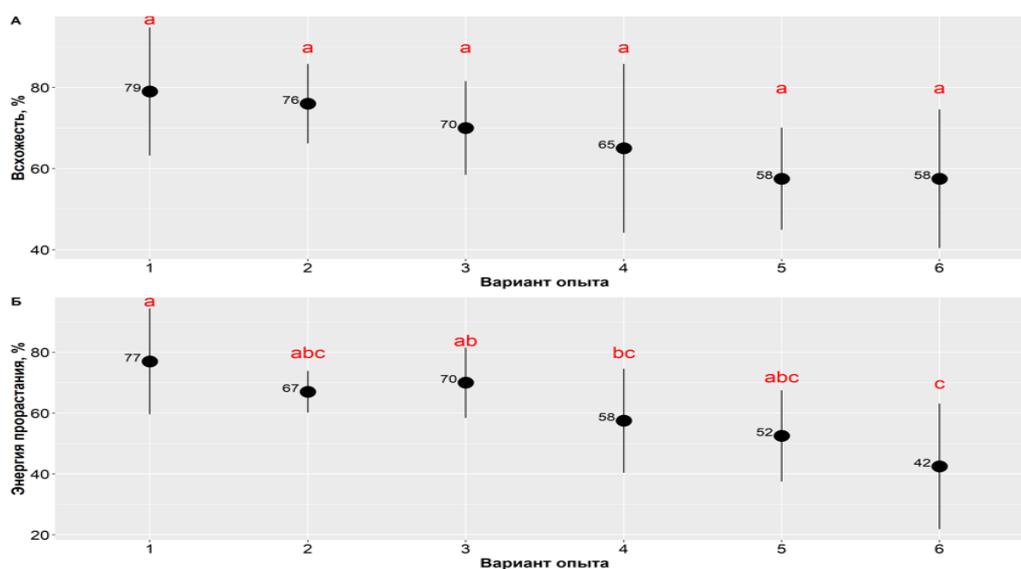


1 – криоконсервация без применения дополнительных физических воздействий (контроль); 2 – обработка методом барботирования; 3 – 1-е магнитное поле в течение 24 часов; 4 – 2-е магнитное поле в течение 24 часов; 5 – 1-е магнитное поле в течение трех суток; 6 – 2-е магнитное поле в течение трех суток

Рисунок 53 – Жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* сорта «Подмосковная» после криохранения с предпосевной обработкой

Примечание – Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами опыта

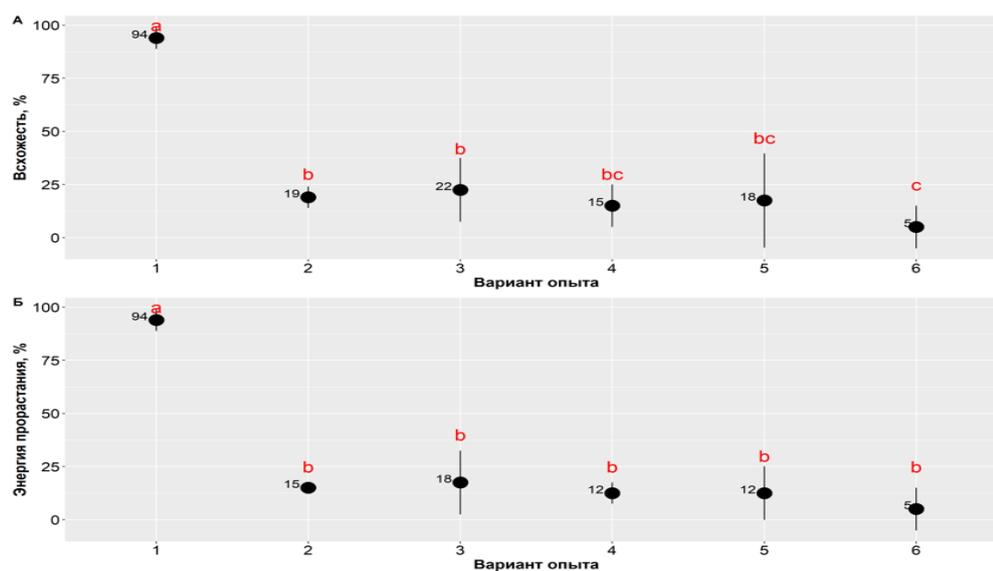
Результаты предобработки семян сорта «Айболит» были следующими. Так, физические методы активации оказались не эффективными в отношении семян данного сорта. Как видно на рисунке 54 ни барботирование, ни действие магнитных полей не повысило всхожесть семян после криоконсервации. Значения опытных групп были ниже контрольных показателей.



1 – криоконсервация без применения дополнительных физических воздействий (контроль); 2 – обработка методом барботирования; 3 – 1-е магнитное поле в течение 24 часов; 4 – 2-е магнитное поле в течение 24 часов; 5 – 1-е магнитное поле в течение трех суток; 6 – 2-е магнитное поле в течение трех суток

Рисунок 54 – Жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* сорта «Айболит» после криохранения с предпосевной обработкой

Примечание – Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами опыта



1 – криоконсервация без применения дополнительных физических воздействий (контроль); 2 – обработка методом барботирования; 3 – 1-е магнитное поле в течение 24 часов; 4 – 2-е магнитное поле в течение 24 часов; 5 – 1-е магнитное поле в течение трех суток; 6 – 2-е магнитное поле в течение трех суток

Рисунок 55 – Жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* сорта «Старый лекарь» после криохранения с предпосевной обработкой

Примечание – Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами опыта

Как видно на рисунке 55 в отношении семян сорта «Старый лекарь» предобработка также оказалась не целесообразной, так как всхожесть оказалась ниже 25%. Результаты показали, что семена данного сорта хорошо переносят криоконсервацию и без предпосевной обработки. Всхожесть в контроле составила 94%.

Таким образом, для повышения всхожести семян *Ch. recutita* сортов «Карагандинская» и «Подмосковная» после криоконсервации рекомендуется использовать предпосевную обработку барботированием и двойным магнитным полем. В отношении же семян сортов «Айболит» и «Старый лекарь» действия физических методов активации всхожести не эффективны.

## 5 СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО НАКОПЛЕНИЯ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ СОРТОВ *CHAMOMILLA RECUTITA* ПОСЛЕ КРИООБРАБОТКИ СЕМЯН

Общеизвестно, что растения являются источником широкого спектра вторичных метаболитов, которые используются в качестве сырья для фармацевтических препаратов, агрохимикатов, ароматизаторов, красителей, биопестицидов и пищевых добавок. Растительные химические соединения включают алколоиды, углеводные компоненты, гликозиды, эфирные масла, смолы, дубильные вещества и другие. Многие из них обладают высокой биологической активностью, что делает их перспективными для использования в медицинской практике [236, 237]. Многие лекарственные растения подвержены исчезновению или снижению количества популяций в естественной среде. Таким образом, важной задачей перед человечеством стоит сохранение их биологического разнообразия без потери их биологически активных свойств в процессе хранения. Одним из перспективных методов является криоконсервация семян, которая позволяет сохранить генетический материал со всеми ее свойствами при длительном хранении. Стоит отметить, что количественное накопление эфирных масел в надземной части растений является важным критерием оценки качества лекарственного сырья.

В связи с выше изложенным, целью настоящего исследования является изучение количественного накопления эфирного масла в надземной части *Ch. recutita*, выращенной из семян после хранения в жидком азоте.

*Ch. recutita* является ценнейшим лекарственным растением, так как эфирные масла, содержащиеся в нем, обладают широким спектром биологического действия и применяются как в медицине, так и в пищевой промышленности. Объектами исследования являлись семена сортов «Карагандинская» и «Подмосковная». Выбор сортов обусловлен тем, что сорт «Подмосковная» является стандартным, а сорт «Карагандинская» культивируется в условиях Центрального Казахстана. В эксперименте семенной материал данных сортов хранился в жидком азоте в течение часа и 3-х часов. Длительность экспозиции позволит выяснить влияние времени хранения семян в жидком азоте на количественное изменение в содержании эфирного масла в надземной части сортов *Ch. recutita*. Семена после криоконсервации были разморожены при комнатной температуре и высажены на открытый грунт. После прорастания надземную часть растения собирали в фазу цветения (Приложение Е).

Изучение количественного накопления эфирных масел в надземной части сортов *Ch. recutita* показало, что криоконсервация повышает количественное содержания в двух сортах, особенно при длительном хранении в жидком азоте (рисунок 56). У сорта «Карагандинская» криогенное хранение семян в жидком азоте на протяжении трех часов способствует увеличению содержания эфирного масла до 85,9 мг, что существенно превосходит контрольный

показатель (22,7 мг). В то же время при кратковременном хранении в жидком азоте содержание эфирного масла в надземной части оказалось минимальным и составило лишь 5,8 мг (рисунок 57). Содержание эфирного масла у сорта «Подмосковная» также повысилось при длительной криоконсервации семян в течение 3-х часов и составило 49,9 мг, что также выше чем в контрольной группе, где значения показали 45,6 мг. Кратковременная криоконсервация семян данного сорта в течение 1 часа понизила содержание эфирного масла и составила 10,9 мг.

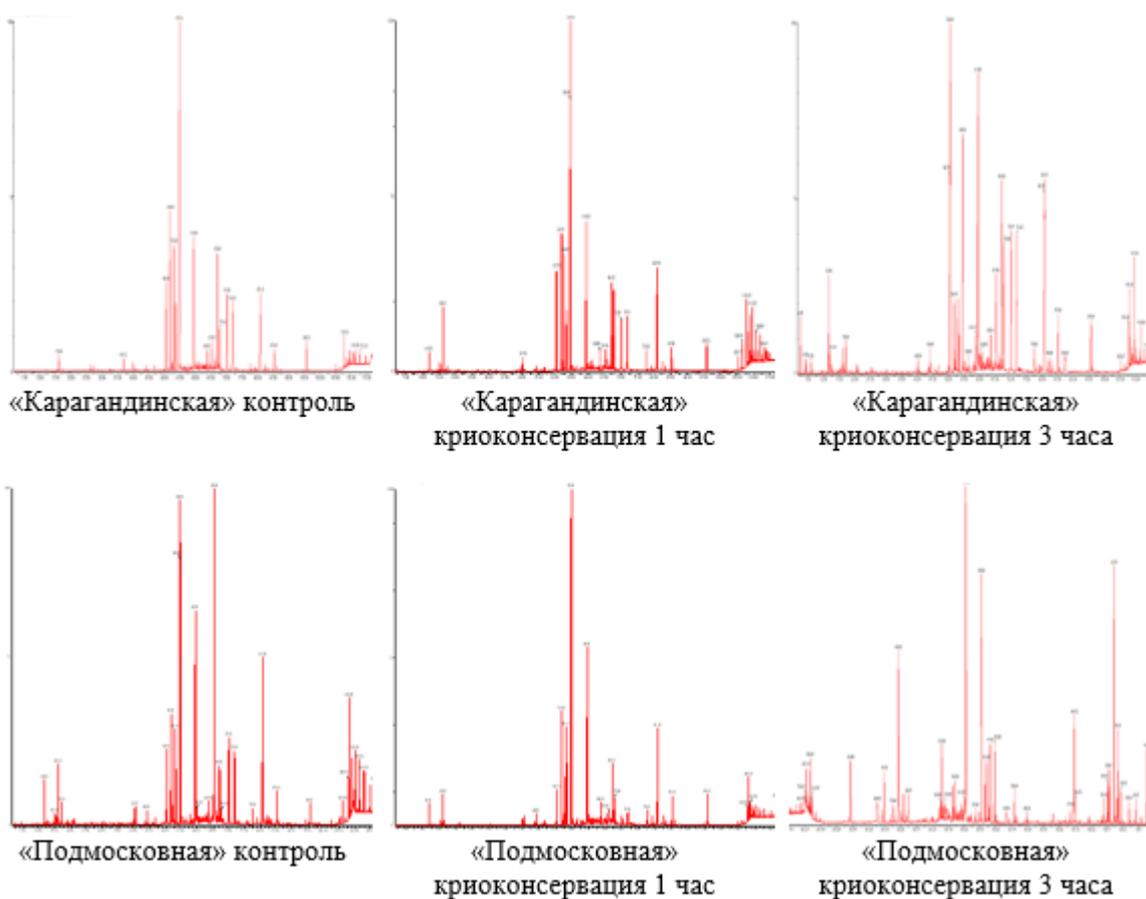
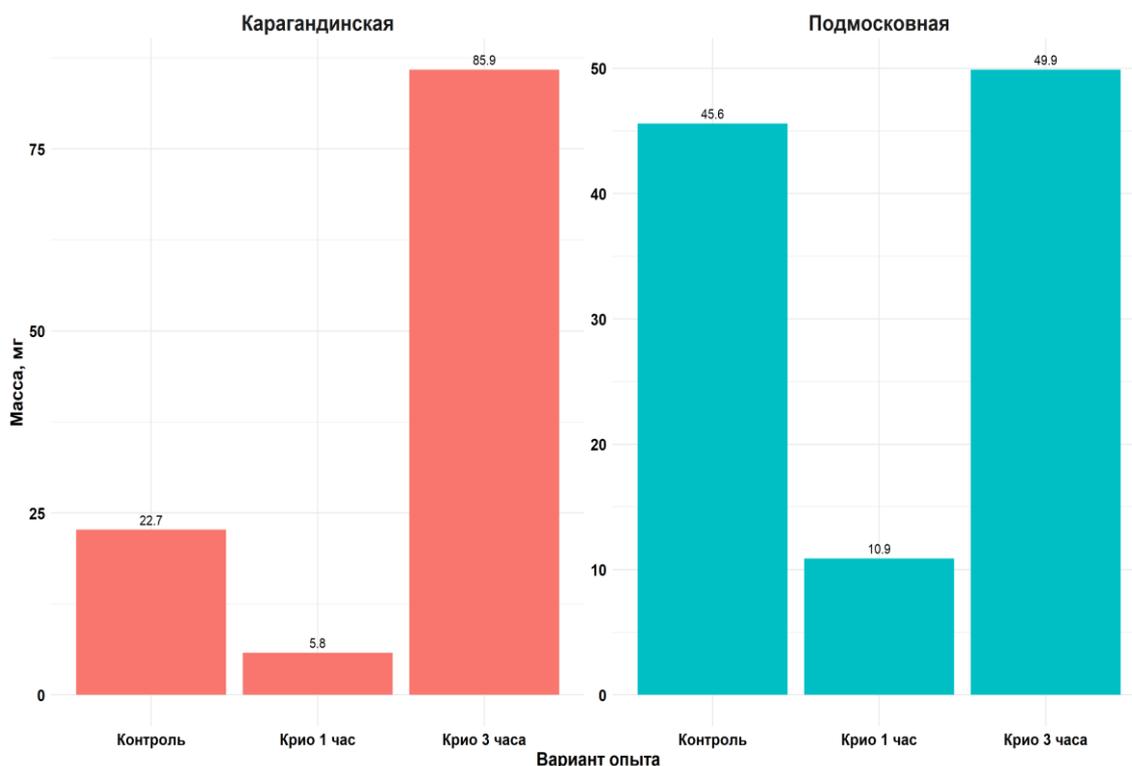


Рисунок 56– Площадь пиков общей хроматограммы ионов эфирного масла надземной части сортов *Chamomilla recutita* после криоконсервации семян

Как указывают ряд авторов механизм повышенного содержания эфирных масел в растениях после действия сверх низких температур объясняется тем, что низкие температуры действуют как стрессовый фактор, который активирует синтез вторичных метаболитов, включая эфирные масла. Растения, прорастающие из замороженных семян, могут реагировать на данное воздействие с повышенной активностью защитных механизмов. Эфирные масла часто играют роль в защите растений от различных стрессов и их синтез может усилиться в ответ на внешнее воздействие экстремальных условий [238, 239]. Также повышение содержания эфирных масел можно объяснить тем, что при криоконсервации по сравнению с традиционными методами лучше

сохраняются химические компоненты в семенах, такие как белки, липиды, углеводы и витамины, замедляются реакции окисления, что в последующем благоприятно отражается на качестве прорастания семян, что и повлияло на увеличение количественного накопления эфирного масла.



– контроль; Крио 1 час – криоконсервация в течение одного часа; Крио 3 часа – криоконсервация в течение 3-х часов

Рисунок 57 – Количественное накопление эфирного масла в надземной части сортов *Chamomilla recutita*, выращенных из семян, хранившихся в жидком азоте

В ходе исследования химического состава эфирного масла надземной части *Ch. recutita* сорта «Подмосковная» было выявлено, что в контрольной группе преобладающими компонентами являются  $\alpha$ -Bisabolol oxide B – 15,7%,  $\alpha$ -Farnesene – 13,8%, cis-ene-yne-Dicycloether – 9,0%, Spathulenol – 8,3%, Germacrene D – 3,5%. Наименьшие процентные показатели у Chamazulene – 3,0% и  $\alpha$ -Bisabolol oxide A – 2,6% (Приложение Ж). В образце *Ch. recutita*, семенной материал которой предварительно был обработан сверхнизкой температурой длительностью 1 час преобладающими компонентами являются  $\alpha$ -Farnesene – 25,2%, Spathulenol – 12,3%, cis-ene-yne-Dicycloether – 7,3%, Germacrene D – 5,9% и Bicyclogermacren – 5,0%. В данном образце очень низкое процентное содержание Chamazulene – 0,5%. В образце с криообработкой длительностью 3 часа основными соединениями являются Spathulenol – 15,3%,  $\alpha$ -Farnesene – 8,1% и cis-ene-yne-Dicycloether – 7,1%. Необходимо отметить, что отличительной особенностью данного образца является полное отсутствие таких компонентов, как Chamazulene,  $\alpha$ -Bisabolol oxide B и  $\alpha$ -Bisabolol oxide A.

Химический состав эфирного масла надземной части *Ch. recutita* сорта «Карагандинская» показал, что в контрольной группе преобладающими компонентами являются  $\alpha$ -Farnesene – 26,5%, Germacrene D – 8,3% и Spathulenol – 6,9%. Наименьшие процентные показатели у  $\alpha$ -Bisabolol – 1,9%,  $\alpha$ -Bisabolol oxide B – 1,5% и Chamazulene – 3,6% (Приложение Ж). В варианте с криохраниением продолжительностью 1 час наблюдается повышенное процентное содержание таких компонентов, как  $\alpha$ -Farnesene – 22,9%, Spathulenol – 8,0%, и Germacrene D – 6,5%, но пониженное содержание Chamazulene – 2,3%. В опыте с криохраниением длительностью три часа основными компонентами являются Spathulenol – 12,4%, cis-ene-ene-Dicycloether – 10,3% и  $\alpha$ -Farnesene – 7,0%. Важно отметить, что в данном варианте опыта фиксируется повышенное %-е содержание Chamazulene до 4,1%, что выше показателя контроля и криообработки длительностью 1 час (Приложение Ж).

Таким образом, длительное хранение семян *Ch. recutita* в жидком азоте повышает количественное и качественное содержание эфирного масла в надземной части у обоих сортов, что подтверждается полученными результатами.

## 6 РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЯН СОРТОВ *CHAMOMILLA RECUTITA*

Разработка алгоритмов криоконсервации семян сортов *Ch. recutita* включала протокол предварительной подготовки семенного материала перед организацией системы хранения в жидком азоте, использование оптимальных условий, температурных условий, оптимальных концентраций криопротекторов, системы оттаивания семян после хранения, а также применение методов физической активации прорастания после краткосрочного и долгосрочного замораживания в сжиженном азоте.

Стоит отметить, что для семян сортов *Ch. recutita* не выявлены одинаковые алгоритмы криоконсервации, так как сорта показали разную эффективность при замораживании. Так, например, наиболее эффективными для всех сортов, кроме сорта «Айболит», являются из непроникающих криопротекторов высококонцентрированная глюкоза, сахароза и фруктоза. По проникающим высококонцентрированный 15%-й ДМСО и низкоконцентрированный 5%-ый пропиленгликоль. При криоконсервации семян сорта «Айболит» использование криопротекторов оказалось неэффективной. Также важным критерием успешной криоконсервации является оптимизация условий размораживания. Согласно полученным данным для сортов «Карагандинская», «Подмосковная» и «Айболит» стоит применять медленное оттаивание семян после криоконсервации, тогда как для сорта «Старый лекарь» необходимо использовать быстрое оттаивание на водяной бане. Ниже приведен алгоритм криоконсервации семян сортов *Ch. recutita*, составленный на основании полученных данных при изучении условий криохранения (рисунок 58).

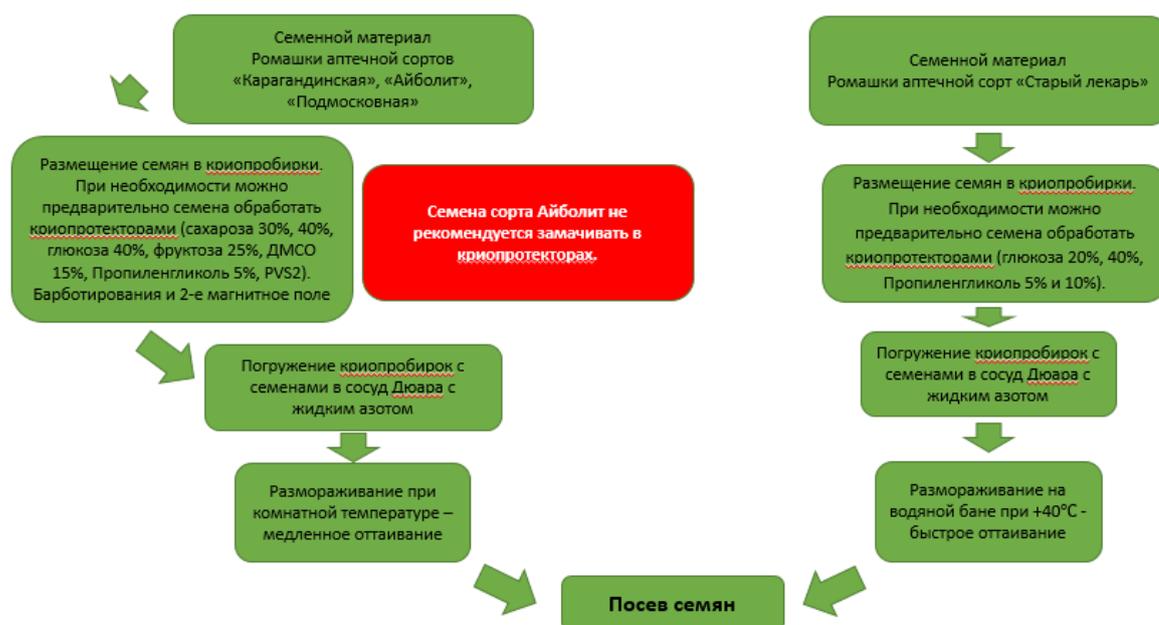


Рисунок 58 – Алгоритм криоконсервации семян *Chamomilla recutita* сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь»

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы наблюдается заметный рост интереса к применению лекарственных растений. Их ключевым достоинством считается низкий уровень токсичности, а также возможность длительного использования без выраженных побочных эффектов. С каждым годом возрастает востребованность трав и препаратов, изготовленных на их основе, что актуализирует задачу расширения ресурсной базы и совершенствования системы семеноводства, включая долгосрочное хранение семян.

На территории Казахстана культивирование лекарственных растений сосредоточено в центральных, южных, юго-восточных и восточных регионах. Однако дальнейшее развитие этих плантаций ограничено отсутствием устойчивой и стабильной семенной базы. Вопросы, касающиеся организации хранения и обеспечения высокого качества семян лекарственных растений, пока остаются недостаточно изученными в стране.

Основные сложности, связанные с созданием семенных банков для лекарственных культур, обусловлены ограниченным производством семян, что снижает на них спрос. Кроме того, на глобальном уровне отмечается нехватка фондов обмена и специализированных банков семян лекарственных растений. Это создает препятствия при закладке крупных плантаций, поскольку найти семена с высокими качественными характеристиками бывает проблематично.

Криоконсервация семян лекарственных растений представляет собой перспективное направление в криобиологии. Обычные условия хранения не всегда гарантируют их долгосрочную жизнеспособность. В зависимости от биологических особенностей растения срок хранения может составлять от полугода до шести лет.

На основе проведенных исследований, направленных на оптимизацию методов криоконсервации семян сортов *Chamomilla recutita* можно сделать следующие **выводы**:

1. Установлено, что при хранении семян сортов *Chamomilla recutita* традиционным методом в течение 3-х лет наблюдается снижение лабораторной всхожести, особенно у сортов «Старый лекарь» и «Подмосковная». Сканирующая электронная микроскопия, анатомия семян и проростков показали, что после криоконсервации оболочки семян исследуемых сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь», не повреждаются, значительные морфологические изменения в структуре поверхности семенной кожуры не наблюдаются, целостность семян сохраняется. Также не наблюдается изменений в анатомических структурах семян и проростков (семядольные листья, гипокотиль, кончик корня) после криохранения исследуемых сортов *Chamomilla recutita*.

2. Определение условий замораживания семян сортов *Chamomilla recutita* показала, что сорта «Карагандинская», «Айболит» и «Старый лекарь» положительно отреагировали на долгосрочное хранение в жидком азоте (6 месяцев). При криохранении семян сорта Подмосковная рекомендуется

использовать краткосрочное сверхглубокое замораживание. Оптимальным режимом оттаивания после криоконсервации является медленное размораживание при комнатной температуре для сортов «Карагандинская», «Айболит» и «Подмосковная»; для сорта «Старый лекарь» рекомендуется использовать быструю разморозку на водяной бане при температуре +40°C.

3. При изучении влияния физических факторов на жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* после криоконсервации было выявлено положительное стимулирующее действие барботирования и магнитного поля на сорта «Карагандинская» и «Айболит». Для сортов «Подмосковная» и «Старый лекарь» физические факторы активации оказались неэффективными. Подбор оптимальных концентраций и видов криопротекторов показал, что наиболее эффективными для всех сортов, кроме сорта «Айболит», являются: из непроникающих криопротекторов - глюкоза (40%), сахароза (40%) и фруктоза (20%, 25%); из проникающих - высококонцентрированный 15%-ый ДМСО и пропиленгликоль (5%, 10%). Также в качестве криопротектора положительное действие оказал раствор PVS2 при криогенном хранении семян сортов «Подмосковная» и «Карагандинская».

4. Обнаружено положительное действие сверхнизких температур на химический состав и количественное накопление эфирного масла в надземной части *Chamomilla recutita*. Так, в растении, выращенной из криоконсервированных семян повышается накопление эфирного масла и увеличивается процентное содержание компонентов сесквитерпенового класса и веществ эфирной группы.

5. По итогам проведенных исследований разработан алгоритм криозамораживания семенного материала 4-х сортов *Chamomilla recutita*.

Семена заложены в криобанк исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга биолого-географического факультета КарУ им. Е.А. Букетова. Получены акты внедрения результатов НИР в деятельность организаций и учебный процесс (Приложение Ж).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Гемеджиева Н.Г. Анализ видового и ресурсного потенциала лекарственной флоры Казахстана // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. ст. – Барнаул, 2015. – Вып. 14. – С. 173-181.
- 2 Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. – М., 2000. – 541 с.
- 3 Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик / Фармакопейный комитет Министерства здравоохранения СССР. – Изд. 10-е. – М.: Медицина, 1968. – 1081 с.
- 4 Государственная фармакопея СССР / под ред. А.П. Арзамасцев, Н.С. Косырева. – Изд. 11-е изд. – М.: Медицина, 1987. – Т. 2. – 397 с.
- 5 Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г., Нелина Н.В. и др. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. – Алматы, 2014. – Т. 20. – 200 с.
- 6 Baskin С.С., Baskin J.M. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. – London: Academic Press, 1998. – 666 p.
- 7 Сафина Г.Ф. Влияние низких и сверхнизких температур на жизнеспособность семян плодовых и ягодных растений // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, №4. – С. 26-34.
- 8 Forsline F. et. al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1998. – Vol. 123, Issue 3. – P. 365-370.
- 9 Нестерова С.В. Криоконсервация семян дикорастущих растений Приморского края: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.32. – Владивосток, 2004. – 150 с.
- 10 Розанов С.И. Место генетических криобанков в решении проблемы сохранения биоразнообразия // Биофизика живой клетки. – 1994. – Т. 6. – С. 8-13.
- 11 Reed В.М. The basics of in vitro storage and cryopreservation // In book: National Clonal Germplasm Repository. – Corvallis, 2002. – P. 34-46.
- 12 Жимулев И.Ф. Криохранение семян: итоги и перспективы. – Новосибирск, 2014. – 110 с.
- 13 Sakai A. Development of cryopreservation techniques // In book: Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. – Rome, 2000. – P. 1-8.
- 14 Кушнарченко С.В., Ковальчук И.Ю., Ромаданова Н.В. и др. Криосохранение апикальных меристем плодовых и ягодных культур: метод. реком. – Алматы, 2008. – 58 с.
- 15 Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). – СПб., 1995. – 992 с.
- 16 Поиск таксонов – Плантариум // <https://www.plantarium.ru>. 10.10.2024.
- 17 Franke R., Schilcher H. Eds. Cultivation // In book: Chamomile: Industrial Profile. – Boca Raton, 2005. – P. 76-108.
- 18 Кузнецов С.М. Легенды о целебных растениях. – Краснодар, 1971. – 104 с.

- 19 Oberprieler C., Vogt R., Watson L.E. XVI. Tribe Anthemideae Cass // Im buch: The Families and Genera of Vascular Plants. – Berlin, 2007. – S. 342-373.
- 20 Inceer H. The genus *Matricaria* L. (Asteraceae) in Turkey // Biodivers. Res. Conserv. – 2019. – Vol. 54. – P. 1-6.
- 21 Inceer H., Ozcan M. Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 18 taxa of *Matricaria* L. and *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Anthemideae-Asteraceae) in Turkey // Plant Syst. Evol. – 2011. – Vol. 296. – P. 205-215.
- 22 Singh O. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview // Pharmacogn. Rev. – 2011. – Vol. 5. – P. 82-95.
- 23 El Mihaoui A. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses // Life. – 2022. – Vol. 12. – P. 479-1-479-41.
- 24 Флора Казахстана: в 9 т. / под ред. Н.В. Павлова. – Алма-Ата: Наука, 1966. – Т. 9. – 640 с.
- 25 Абдуллина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. – Алматы, 1999. – 187 с.
- 26 Мельникова Т.М. Некоторые вопросы семеноведения лекарственных культур // Биология, селекция и семеноводство лекарственных культур: сб. науч. тр – М., 1984. – Вып. 2. – С. 122-135.
- 27 Овчаров К.Е. Физиологические основы всхожести семян. – М.: Наука, 1969. – 279 с.
- 28 Кушке Э.Э. Ромашка аптечная // В кн. Культура лекарственных растений. – М.: Россельхозиздат, 1952. – С. 346.
- 29 Атлас лекарственных растений / под ред. Н.В. Цицина. – М., 1962. – 704 с.
- 30 Грызлов В.П., Турова А.Д. Ромашка аптечная. – М., 1957. – 346 с.
- 31 Plants of the World Online // <https://powo.science.kew.org>. 10.10.2024.
- 32 Lim, T.K. *Matricaria chamomilla*. In Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants // Springer: Dordrecht, The Netherlands. – 2014. – Vol. 7. – P. 397-431.
- 33 McKay D.L., Blumberg J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.) // Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv. – 2006. – Vol. 20. – P. 519-530.
- 34 Fennane M. Etude phytoécologique des tétraclinaies marocaines. Thèse de Doctorat. Aix-Marseille 3. Phytosociologie des tétraclinaies marocaines // Bull. L'institutSci. Rabat. – 1987. – Vol. 12. – P. 99-148.
- 35 Mrabti H.N., Bouyahya A., Naceiri Mrabti N. et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by traditional healers to treat diabetes in the Taza region of Morocco // Evid.-Based Complement. Altern. Med. – 2021. – Vol. 2021. – P. 5515634-1-551634-16.
- 36 Mrabti H.N., Jaradat N., Kachmar M.R. et al. Integrative herbal treatments of diabetes in Beni Mellal region of Morocco // J. Integr. Med. – 2019. – Vol. 17. – P. 93-99.

- 37 Mikou K., Rachiq S., Jarrar Oulidi A. Étude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans la ville de Fès au Maroc // *Phytotherapie.* – 2016. – Vol. 14. – P. 35-43.
- 38 Eddouks M., Ajebli M., Hebi M. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco // *J. Ethnopharmacol.* – 2017. – Vol. 198. – P. 516-530.
- 39 Idm'hand E., Msanda F., Cherifi K. Ethnobotanical study and biodiversity of medicinal plants used in the Tarfaya Province, Morocco // *Acta Ecol. Sin.* – 2020. – Vol. 40. – P. 134-144.
- 40 Benítez G. et al. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis // *J. Ethnopharmacol.* – 2010. – Vol. 129. – P. 87-105.
- 41 Parada M., Carrió E., Bonet M.À. et al. Ethnobotany of the Alt Empordà region (Catalonia, Iberian Peninsula). Plants used in human traditional medicine // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – Vol. 124. – P. 609-618.
- 42 Neves J.M., Matos C., Moutinho C. et al. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal) // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – Vol. 124. – P. 270-283.
- 43 Güzel Y. et al. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey // *J. Ethnopharmacol.* – 2015. – Vol. 174. – P. 118-152.
- 44 Menale B., De Castro O., Di Iorio E. et al. Discovering the ethnobotanical traditions of the island of Procida (Campania, southern Italy) // *Plant Biosyst. An Int. J. Deal. All Asp. Plant Biol.* – 2021. – Vol. 156, Issue 4. – P. 1-37.
- 45 Tuttolomondo T. et al. Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani Regional Park (Sicily, Italy) // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – Vol. 153. – P. 568-586.
- 46 Di Novella R. et al. Traditional plant use in the National Park of Cilento and Vallo di Diano, Campania, Southern, Italy // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – Vol. 145. – P. 328-342.
- 47 Živkovi'c J. et al. Traditional use of medicinal plants in South-Eastern Serbia (P'cinja District): Ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1020-1-1020-12.
- 48 Markovi'c M.S. et al. Ethnoveterinary knowledge in Pirot County (Serbia) // *S. Afr. J. Bot.* – 2021. – Vol. 137. – P. 278-289.
- 49 Jana'ckovi'c P. et al. Traditional knowledge on plant use from Negotin Krajina (Eastern Serbia): An ethnobotanical study // *Indian J. Tradit. Knowl.* – 2019. – Vol. 18. – P. 25-33.
- 50 Živkovi'c J. et al. Traditional use of medicinal plants in Jablanica district (South-Eastern Serbia): Ethnobotanical survey and comparison with scientific data // *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2021. – Vol. 68. – P. 1655-1674.

- 51 Šavikin K. et al. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – Vol. 146. – P. 803-810.
- 52 Zlatkovi'c B.K. et al. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – Vol. 151. – P. 704-713.
- 53 Petrakou K., Iatrou G., Lamari F.N. Ethnopharmacological survey of medicinal plants traded in herbal markets in the Peloponnisos, Greece // *J. Herb. Med.* – 2020. – Vol. 19. – P. 100305.
- 54 Pieroni A. Traditional uses of wild food plants, medicinal plants, and domestic remedies in Albanian, Aromanian and Macedonian villages in South-Eastern Albania // *J. Herb. Med.* – 2017. – Vol. 9. – P. 81-90.
- 55 Kozuharova E., Lebanova H., Getov I. et al. Descriptive study of contemporary status of the traditional knowledge on medicinal plants in Bulgaria // *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 7. – P. 185-198.
- 56 Orav A., Raal A., Arak E. Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries // *Nat. Prod. Res.* – 2010. – Vol. 24. – P. 48-55.
- 57 Piri E., Sourestani M.M., Khaleghi E. et al. Chemo-diversity and antiradical potential of twelve *Matricaria chamomilla* L. populations from Iran: Pproof of ecological effects // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – P. 1315-1-1315-14.
- 58 Ghasemi M., Jelodar N.B. et al. Increase of chamazulene and  $\alpha$ -bisabolol contents of the essential oil of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) using salicylic acid treatments under normal and heat stress conditions // *Foods.* – 2016. – Vol. 5. – P. 56-1-56-14.
- 59 Mavandi P., Assareh M.H., Dehshiri A. et al. Flower biomass, essential oil production and chemotype identification of some Iranian *Matricaria chamomilla* Var. *recutita* (L.) accessions and commercial varieties // *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* – 2019. – Vol. 22. – P. 1228-1240.
- 60 Abbas A.M., Seddik M.A., Gahory A.A. et al. Differences in the aroma profile of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) after different drying conditions // *Sustainability.* – 2021. – Vol. 13. – P. 5083-1-5083-9.
- 61 Homami S.S., Jaimand K., Rezaee M.B. et al. Comparative studies of different extraction methods of essential oil from *Matricaria recutita* L. in Iran // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2016. – Vol. 61. – P. 2982-2984.
- 62 Zarezadeh S., Riahi H., Shariatmadari Z. et al. Effects of cyanobacterial suspensions as bio-fertilizers on growth factors and the essential oil composition of chamomile, *Matricaria chamomilla* L. // *J. Appl. Phycol.* – 2020. – Vol. 32. – P. 1231-1241.
- 63 El-Assri E.-M., Eloutassi N., El Barnossi A. et al. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L) from the Taounate Province, Morocco: Extraction and valorisation of the antibacterial activity of its essential oils. *Trop.* // *J. Nat. Prod. Res.* – 2021. – Vol. 5. – P. 883-888.

64 EL-Hefny M. et al. Essential and recovery oils from *Matricaria chamomilla* flowers as environmentally friendly fungicides against four fungi isolated from cultural heritage objects // *Processes*. – 2019. – Vol. 7. – P. 809-1-809-12.

65 Ayran I., Çelik S.A., Kan A. et al. Essential oil yield and compositions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) cultivated in different province of Turkey // *Int. J. Agric. Environ. Food Sci.* – 2018. – Vol. 2. – P. 202-203.

66 Berechet M.D., Manaila E., Stelescu M.D. et al. The composition of essential oils obtained from *Achillea millefolium* and *Matricaria chamomilla* L., Originary from Romania // *Rev. Chim.* – 2017. – Vol. 68. – P. 2787-2795.

67 Demarque D.P., Sabóia J.F., Fabri J.R. et al. Allelopathic activity of *Matricaria chamomilla* essential oil by the bioautography test // *Allelopath. J.* – 2012. – Vol. 29. – P. 171-176.

68 Formisano C., Delfino S., Oliviero F. et al. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy) // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – Vol. 63. – P. 256-263.

69 Baghalian K., Haghiri A., Naghavi M.R. et al. Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.) // *Sci. Hortic.* – 2008. – Vol. 116. – P. 437-441.

70 Ayoughi F., Marzegar M. et al. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. And endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects // *J. Agric. Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 13. – P. 79-88.

71 Farhoudi R. Chemical constituents and antioxidant properties of *Matricaria recutita* and *Chamaemelum nobile* essential oil growing wild in the South West of Iran // *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* – 2013. – Vol. 16. – P. 531-537.

72 Hosseinzadeh Z., Piryaee M., Asl M.B. et al. ZnO polythiophene SBA-15 nanoparticles as a solid-phase microextraction fiber for fast determination of essential oils of *Matricaria chamomilla*. *Nanochem. Res.* – 2018. – Vol. 3. – P. 124-130.

73 Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria recutita* // *Int. J. Food Prop.* – 2015. – Vol. 18. – P. 1784-1792.

74 Mahmoudi A., Karami M., Ebadi M.T. et al. Effects of infrared drying and air flow rate on qualitative parameters // *Iran. J. Med. Aromat. Plants Res.* – 2020. – Vol. 36. – P. 709-723.

75 Ganzera M., Schneider P., Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78. – P. 856-861.

76 Heuskin S., Godin B., Leroy P. et al. Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae). *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216. – P. 2768-2775.

77 Ugi B.U., Abeng F.E., Obeten M.E. et al. Management of aqueous corrosion of federated mild steel (Local constructional steel) at elevated temperatures employing environmentally friendly inhibitors: *Matricaria chamomilla* plant // *Int. J. Chem. Sci.* – 2019. – Vol. 3. – P. 6-12.

78 Abdalla R.M., Abdelgadir A.E. Antibacterial activity and phytochemical constituents of *Cinnamomum verum* and *Matricaria chamomilla* from Sudan // *Bio Bull.* – 2016. – Vol. 2. – P. 8-12.

79 Elsemelawy S.A. Antidiabetic and antioxidative activity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) powder on diabetic rats // *J. Stud. Searches Specif. Educ.* – 2017. – Vol. 3. – P. 501-520.

80 Petruľ'ová-Poracká V. et al. Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141. – P. 54-59.

81 Petruľova V., Vilková M. et al. Ethylene Induction of non-enzymatic metabolic antioxidants in *Matricaria chamomilla* // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – P. 5720-1-5720-16.

82 Kováčik J. et al. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants // *Plant Soil.* – 2009. – Vol. 320. – P. 231-242.

83 Sayyar Z. et al. Protective effect of *Matricaria chamomilla* ethanolic extract on hippocampal neuron damage in rats exposed to formaldehyde // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-10.

84 Zhao Y., Sun P., Ma Y. et al. Simultaneous quantitative determination of six caffeoylquinic acids in *Matricaria chamomilla* L. with high-performance liquid chromatography // *J. Chem.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 4352832.

85 Ma X., Zhao D., Li X. et al. Chromatographic method for determination of the free amino acid content of chamomile flowers // *Pharmacogn. Mag.* – 2015. – Vol. 11, Issue 41. – P. 176-179.

86 Qureshi M.N., Stecher G., Bonn G.K. Quality control of herbs: Determination of amino acids in *Althaea officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Taraxacum officinale* // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 27. – P. 459-462.

87 Ghoniem A.A. et al. Enhancing the potentiality of *Trichoderma harzianum* against pythium pathogen of beans using chamomile (*Matricaria chamomilla*, L.) flower extract // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – P. 1178-1-1178-17.

88 Dadashpour M. et al. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2018. – Vol. 92. – P. 902-912.

89 Alshehri A.A., Malik M.A. Phytomediated photo-induced green synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* L. and its catalytic activity against rhodamine B. // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1604-1-1604-24.

90 Ali A.E., Ali S.M.E.H. et al. Brine-shrimp lethality bioassay of different extracts of the medicinal plant *matricaria* (*chamomilla*) flowers // *J Med Healthcare.* – 2022. – Vol. 4, Issue 6. – P. 1-4.

91 Stanojevic L.P. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) // *J. Essent. Oil Bear. Plants.* – 2016. – Vol. 19. – P. 2017-2028.

92 Mahdavi B., Ghorat F., Nasrollahzadeh M.S. et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxicity, and hemolyses activity of essential oils from

flower of *Matricaria chamomilla* var. *Chamomilla* // *Anti-Infect. Agents.* – 2020. – Vol. 18. – P. 224-232.

93 Melo-Guerrero M.C. et al. Comparison of the composition and antioxidant activity of the chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) obtained by supercritical fluids extraction and other green techniques // *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Fis. Nat.* – 2020. – Vol. 44. – P. 845-856.

94 Munir N., Iqbal A.S., Altaf I. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa belladonna* and *Matricaria chamomilla* // *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* – 2014. – Vol. 11. – P. 111-117.

95 De Franco E.P.D. et al. Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: Antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes // *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 35. – P. 42-49.

96 Elmastas M., Inkiliç S.Ç., Aboul-Enein H.Y. Antioxidant capacity and determination of total phenolic compounds in daisy (*Matricaria chamomilla*, Fam. Asteraceae) // *World J. Anal. Chem.* – 2015. – Vol. 3. – P. 9-14.

97 Abdoul-Latif F.M., Mohamed N., Edou P. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti // *J. Med. Plants Res.* – 2011. – Vol. 5. – P. 1512-1517.

98 Molnar M. et al. Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions // *Chem. Cent. J.* – 2017. – Vol. 11. – P. 78-1-78-8.

99 Singh K.G., Sonia S., Konsoor N. In vitro and ex-vivo studies on the antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic properties of *Camellia sinensis*, *Hibiscus rosa sinensis*, *Matricaria chamomilla*, *Rosa* sp., *Zingiber officinale* tea extracts // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* – 2018. – Vol. 9. – P. 3543-3551.

100 Owlia P., Rosooli I., Saderi H. et al. Retardation of biofilm formation with reduced productivity of alginate as a result of Псевдомонада аэругиноза exposure to *Matricaria chamomilla* essential oil // *J. Pharmacogn. Mag.* – 2007. – Vol. 3, Issue 10. – P. 65-131.

101 Silva N.C.C., Barbosa L., Seito L.N. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants // *Nat. Prod. Res.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1510-1514.

102 Chouhan S., Sharma K., Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-Present status and future perspectives // *Medicines.* – 2017. – Vol. 4. – P. 58-1-58-21.

103 Owlia P., Rasooli I., Shahed H. Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L. // *Res. J. Biol. Sci.* – 2007. – Vol. 2. – P. 155-160.

104 Sakkas H., Economou V., Gousia P. et al. Antibacterial efficacy of commercially available essential oils tested against drug-resistant gram-positive pathogens // *Appl. Sci.* – 2018. – Vol. 8. – P. 11-1-11-12.

105 Shakya V.K., Luqman S., Tikku A.P. et al. A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with

calcium hydroxide and chlorhexidine gel against Энтерококк фекалис in ex vivo root canal models // J. Conserv. Dent. – 2019. – Vol. 2, Issue 1. – P. 34-39.

106 Satyal P., Shrestha S., Setzer W.N. Composition and bioactivities of an (E)- $\beta$ -farnesene chemotype of chamomile (*Matricaria chamomilla*) essential oil from Nepal // Nat. Prod. Commun. – 2015. – Vol. 10. – P. 1453-1457.

107 Hartmann K.C., Onofre S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da camoantimicrobial activity of the essential oils of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) // Rev. Saúde Pesqui. – 2010. – Vol. 3. – P. 279-284.

108 Höferl M., Wanner J., Tabanca N. et al. Biological activity of *Matricaria chamomilla* essential oils of various chemotypes // Planta Med. Int. Open. – 2020. – Vol. 7. – P. e114-e121.

109 Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.-H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) // Ind. Crops Prod. – 2013. – Vol. 44. – P. 437-445.

110 Ismail M.C., Waleed S., Ibrahim K. et al. Synergistic interaction between chamomile flower (*Matricaria chamomilla* L.) extracts and tetracycline against wound infection bacteria // J. Al-Nahrain Univ. Sci. – 2013. – Vol. 16. – P. 191-195.

111 Alibabaei Z., Rabiei Z., Rahnama S. et al. *Matricaria chamomilla* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine // Biomed. Aging Pathol. – 2014. – Vol. 4. – P. 355-360.

112 Abdi P. et al. The Effect of *Matricaria chamomilla* alcoholic extract on phenotype detection of efflux pumps of methicillin resistant Стафилококк золотистый (MRSA) isolated from skin lesions. Iran. // J. Med. Microbiol. – 2019. – Vol. 13. – P. 220-231.

113 Ahani Azari A., Danesh A. Antibacterial effect of *Matricaria chamomilla* alcoholic extract against drug-resistant isolates of Стафилококк золотистый and Псевдомонада аэругиноза // Infect. Epidemiol. Microbiol. – 2021. – Vol. 7. – P. 29-35.

114 Bayoub K., Baibai T., Mountassif D. et al. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9. – P. 4251-4258.

115 Boudieb K. et al. Phytochemical characterization and antimicrobial potentialities of two medicinal plants, *Chamaemelum nobile* (L.) All and *Matricaria chamomilla* (L.) // Int. J. Innov. Approaches Sci. Res. – 2018. – Vol. 2. – P. 126-139.

116 Carvalho A.F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) // Rev. Bras. Plantas Med. – 2014. – Vol. 16. – P. 521-526.

117 Cvetanović A. et al. The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts // Food Chem. – 2019. – Vol. 271. – P. 328-337.

118 Khashan A.A., Hamad M.A., Jadaan M.S. In vivo antimicrobial activity of *Matricaria chamomilla* extract against pathogenic bacteria induced skin infections in mice // Syst. Rev. Pharm. – 2020. – Vol. 11. – P. 672-676.

119 Malm A. et al. Anti-Helicobacter pylori activity in vitro of chamomile flowers, coneflower herbs, peppermint leaves and thyme herbs-A preliminary report // *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 28. – P. 30-32.

120 Niknam S., Tofighi Z., Faramarzi M.A. et al. Polyherbal combination for wound healing: *Matricaria chamomilla* L. and *Punica granatum* L. // *DARU J. Pharm. Sci.* – 2021. – Vol. 29. – P. 133-145.

121 Omran A.M. Antimicrobial and phytochemical study of *Matricaria chamomilla* L., *Mentha longifolia* L. and *Salvia officinalis* L. // *Plant Arch.* – 2018. – Vol. 18. – P. 387-397.

122 Peerzada T., Gupta J. Distribution of phytochemicals in stems and leaves of *Cichorium intybus* and *Matricaria chamomilla*: Assessment of their antioxidant and antimicrobial potential // *J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* – 2018. – Vol. 99. – P. 119-128.

123 Poudineh F., Azari A.A., Fozouni L. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Matricaria chamomilla*, *Malva sylvestris*, and *Capsella bursa-pastoris* against multidrug-resistant *Псевдомонада аэругиноза* strains // *Hamadan Univ. Med. Sci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 23-26.

124 Sadat S.S., Ahani Azari A., Mazandarani M. Evaluation of antibacterial activity of ethanolic extract of *Matricaria chamomilla*, *Malva sylvestris* and *Capsella bursa-pastoris* against methicillin-resistant *Стафилококк золотистый* // *J. Med. Microbiol. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 8. – P. 127-131.

125 Asadi Z., Ghazanfari T., Hatami H. Anti-inflammatory effects of *Matricaria chamomilla* extracts on BALB/c mice macrophages and lymphocytes // *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* – 2020. – Vol. 19. – P. 63-73.

126 Ortiz M.I. et al. Synergistic interaction of *Matricaria chamomilla* extract with diclofenac and indomethacin on carrageenan-induced inflammation in rats // *Drug Dev. Res.* – 2017. – Vol. 78. – P. 360-367.

127 Nargesi S. et al. The effects of *Matricaria chamomilla* L. hydroalcoholic extract on atherosclerotic plaques, antioxidant activity, lipid profile and inflammatory indicators in rats // *Biomed. Res. Ther.* – 2018. – Vol. 5. – P. 2752-2761.

128 Ali E.M. Phytochemical composition, antifungal, antiaflatoxigenic, antioxidant, and anticancer activities of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Matricaria chamomilla* L. essential oils // *J. Med. Plants Res.* – 2013. – Vol. 7. – P. 2197-2207.

129 Romeilah R.M. Anticancer and antioxidant activities of *Matricaria chamomilla* L. and *Marjorana hortensis* essential oils // *Res. J. Med. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 4. – P. 332-339.

130 Nikseresht M., Kamali A.M., Rahimi H.R. et al. The hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* suppresses migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-468 and MCF-7 cell lines // *Pharmacogn. Res.* – 2017. – Vol. 9. – P. 87-95.

131 Kamali A.M., Nikseresht M., Delaviz H. et al. In vitro cytotoxic activity of *Matricaria chamomilla* root extract in Human breast cancer cell line MCF-7 // *Life Sci. J.* – 2014. – Vol. 11. – P. 403-406.

132 Fraihat A., Alatrash L., Abbasi R. et al. Inhibitory effects of methanol extracts of selected plants on the proliferation of two human melanoma cell lines // *Trop. J. Pharm. Res.* – 2018. – Vol. 17. – P. 1081-1086.

133 Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P. et al. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: Perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – Vol. 65. – P. 582-591.

134 Wu Y., Xu Y., Yao L. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) // *J. Essent. Oil Bear. Plants.* – 2012. – Vol. 15. – P. 37-41.

135 Mekonnen A., Yitayew B., Tesema A. et al. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperii*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis* // *Int. J. Microbiol.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 9545693.

136 Hameed R.H., Mohammed G.J., Hameed I.H. *Matricaria chamomilla*: Bioactive compounds of methanolic fruit extract using GC-MS and FTIR techniques and determination of its antimicrobial properties // *Indian J. Public Health Res. Dev.* – 2018. – Vol. 9. – P. 188-194.

137 Lavanya J. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of selected medicinal plants against human oral pathogens // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 8. – P. 71-78.

138 Hosseinpour M., Mobini-dehkordi M., Saffar B. et al. Antiproliferative effects of *Matricaria chamomilla* on *Saccharomyces cerevisiae* // *J. HerbMed Pharmacol.* – 2013. – Vol. 2. – P. 49-51.

139 Omran A.M. Antimicrobial and phytochemical study of *Matricaria chamomilla* L., *Mentha longifolia* L. and *Salvia officinalis* L. // *Plant Arch.* – 2018. – Vol. 18. – P. 387-397.

140 Rahman H., Chandra A. Microbiologic evaluation of *Matricaria* and chlorhexidine against *E. faecalis* and *C. albicans* // *Indian J. Dent.* – 2015. – Vol. 6. – P. 60-64.

141 Hajaji S. et al. Leishmanicidal activity of  $\alpha$ -bisabolol from Tunisian chamomile essential oil // *Parasitol. Res.* – 2018. – Vol. 117, Issue 9. – P. 2855-2867.

142 Hajaji S., Alimi D., Jabri M.A. et al. Anthelmintic activity of Tunisian chamomile (*Matricaria recutita* L.) against *Haemonchus contortus* // *J. Helminthol.* – 2018. – Vol. 92. – P. 168-177.

143 Mansour S.A. et al. Toxicity of essential plant oils, in comparison with conventional insecticides, against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål) // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – Vol. 63. – P. 92-99.

144 Al-Jabr A.M. Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) // *Sci. J. King Faisal Univ.* – 2006. – Vol. 7. – P. 49-60.

145 Romero M.D.C. et al. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis // *Phytomedicine.* – 2012. – Vol. 19. – P. 520-523.

- 146 Hajaji S., Sifaoui I., López-Arencibia A. et al. Correlation of radical-scavenging capacity and amoebicidal activity of *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) // *Exp. Parasitol.* – 2017. – Vol. 183. – P. 212-217.
- 147 Váradyová Z. et al. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus* // *Exp. Parasitol.* – 2018. – Vol. 195. – P. 71-77.
- 148 Государственная фармакопея СССР / под ред. А.Р. Ананьева и др. – Изд. 11. – М., 1987. – Вып. 1. – 332 с.
- 149 Растительное сырье / под ред. А.А. Федорова. – М.; Л.: Изд. АН СССР, 1962. – 302 с.
- 150 Крайер Г.К., Пашкевич В.В. Ромашка аптечная // В кн. Культура лекарственных растений. – М., 1934. – С. 192-194.
- 151 Биологическая селекция и семеноводство лекарственных культур: сб. ст. / под ред. А.И. Брыкина и др. – М.: Колос, 1982. – 171 с.
- 152 Селекция, семеноводство и интродукция в Казахстане: сб. тр. – под ред. В.М. Костромина и др. – Алма-Ата: Кайнар, 1988. – 203 с.
- 153 Крейер Г.К. Главнейшие достижения в области изучения лекарственных растений и их культуры // В кн.: Достижения и перспективы в области прик. ботаники, генетики и селекции. – Л., 1929. – 270 с.
- 154 Dafert O., Rudolf S. Der einfluss einer verschiedenen Dungung auf die Menge der wertbildenden stoffe bei Koriander, Anis, Kamille und Paprica // *Heil und Gewurzplf.* – 1925. – Vol. 8. – S. 83-92.
- 155 Hecht W. Zur Dungungfahg der Kamille, *Matricaria chamomilla* // *Heil und Gewurzplf.* – 1922. – Vol. 5. – S. 1-33.
- 156 Swami H.S. Compendium of medicinal and aromatic plant Asia. – Trieste, 2006. – 295 p.
- 157 Galauibosi B., Szebeni-Galauibosi Zs., Repcak M. et al. Variation in the yield und essenttal oil of four chamomile varieties grown in Finland in 1985-88 // *J. Agr. Sci. Finel.* – 1991. – Vol. 63, Issue 5. – P. 403-410.
- 158 Пат. 667205, Швейцария, МКИ А61 К 35/78, А61 К 31/015. Herstellung von Kamillenaus zugen und at herischem Oel aus einertetraploiden Kamillensorte / Chloerg F. et al.
- 159 Камбурова К.С., Делечев С.Д., Тодорова А.С. Ромашка аптечная сорта Лазур // *Растительные ресурсы: сб.* – М., 1983. – Вып. 9. – С. 73.
- 160 Fejer J., Salamon I. Breeding of German chamomile, *Matricaria recutita* L., with a high content of  $\alpha$ -bisabolol // *Proceed. 29 th of the Symposia of the V World Congress on Medicinal and Aromatic Plants and internat. sympos. on Plants, as Factories of Natural Substances, Edible and Essential Oils Eds.* – Presov, 2016. – P. 287-292.
- 161 Otto L.-G., Junghanns W.R., Plescher A. et al. Towards breeding of triploid chamomile (*Matricaria recutita* L.) – Ploidy variation within German chamomile of various origins // *Plant Breeding.* – 2015. – Vol. 134. – P. 485-493.

- 162 Селекция эфирно-масличных культур, технология их возделывания и переработки: сб. науч. тр. / под ред. В.А. Шляпникова и др. – Симферополь, 1989. – 206 с.
- 163 Методы и результаты селекции и семеноводства овощных и полевых культур: сб. ст. / под ред. С.Н. Щербака. – Воронеж, 1976. – 243 с.
- 164 Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений // <https://reestr.gosstrf.ru/>. 10.10.2024.
- 165 Криохранение семян: итоги и перспективы / под ред. И.Ф. Жимулева и др. – Новосибирск, 2014. – 110 с.
- 166 Reed В.М. Plant cryopreservation: a practical guide. – NY.: Springer, 2008. – 513 p.
- 167 Жегунов Г.Ф., Нардид О.А. и др. Основы криобиологии и криомедицины. – Харьков, 2019. – 614 с.
- 168 Benelli C. Plant Cryopreservation: A Look at the Present and the Future // Plants. – 2021. – Vol. 10. – P. 2744-1-2744-5.
- 169 Volk G.M., Waddell J., Bonnart R. et al. High viability of dormant Malus buds after 10 years of storage in liquid nitrogen vapour // Cryo-Letters. – 2008. – Vol. 29. – P. 89-94.
- 170 Jenderek M.M., Reed В.М. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System // Vit. Cell. Dev. Biol.-Plant. – 2017. – Vol. 53. – P. 299-308.
- 171 Чанотей Д., Осипенко А.Е. Криоконсервация - передовая технология сохранения генетических ресурсов лесных растений (обзор иностранной литературы) // Леса России и хозяйство в них. – 2022. – №4. – С. 56-65.
- 172 Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9. – P. 30-33.
- 173 Hirano T., Godo T., Mii M. et al. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 23. – P. 534-539.
- 174 Thammasiri K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification // Cryo Letters. – 2000. – Vol. 21, Issue 4. – P. 237-244.
- 175 Hirano T., Yukawa T., Miyoshi K. et al. Wide applicability of cryopreservation with vitrification method for seeds of some *Cymbidium* species // Plant Biotechnology. – 2011. – Vol. 28. – P. 99-102.
- 176 Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G. et al. Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification // Cryoletters. – 2003. – Vol. 24, Issue 6. – P. 381-388.
- 177 Hirano T., Ishikawa K., Mii M. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *Suzukiana* by vitrification // CryoLetters. – 2005. – Vol. 26. – P. 139-146.
- 178 Sakai A., Engelmann F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review // CryoLetters. – 2007. – Vol. 28, Issue 3. – P. 151-172.

- 179 Flachslund E., Terada G., Scocchi A. et al. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration // *CryoLetters*. – 2006. – Vol. 27, Issue 4. – P. 235-242.
- 180 Surenciski M.R., Flachslund E.A., Terada G. et al. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration // *Biocell*. – 2012. – Vol. 36, Issue 1. – P. 31-36.
- 181 Imsomboon T., Thammasiri K. Cryopreservation of *Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe seeds using encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration methods // [https://www.actahort.org/books/1298/1298\\_28.htm](https://www.actahort.org/books/1298/1298_28.htm). 10.10.2024.
- 182 Behzad K.L. et al. Cryopreservation of Lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] Germplasm by Encapsulation-Dehydration // *Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 136, Issue 4. – P. 491-493.
- 183 Kolahdoozan M., Ghamari-Zare A., Shahrzad Sh. et al. Cryopreservation of *Medicago rigidula* seeds by two methods of vitrification and encapsulation-dehydration // *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. – 2009. – Vol. 17, Issue 1. – P. 50-60.
- 184 Brian Wowk. HOW Cryoprotectants Work. *Cryonics/Third Quarter 2007* // <https://www.cryonicsarchive.org/docs/how-cryoprotectants-work.pdf>. 10.10.2024.
- 185 Karow A.M. Cryoprotectants-a new class of drugs // *J. Pharm. Pharmac.* – 1969. – Vol. 21. – P. 209-223.
- 186 Fullery M., MacFarlane D.R., Angell C.A. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology*. – 1984. – Vol. 21. – P. 407-426.
- 187 Bhattacharya S., Prajapati B.G. A Review on Cryoprotectant and its Modern Implication in Cryonics // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 10, Issue 3. – P. 154-159.
- 188 Fahy G.M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 48. – P. 22-35.
- 189 Bakaltcheva I.B., Odeyale C.O., Spargo B.J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis // *Biochem Biophys Acta*. – 1996. – Vol. 1280. – P. 73-80.
- 190 Воронкова Н.М. Устойчивость семян дикорастущих растений Сахалинской области к воздействию сверхнизких температур // *Биота и среда природных территорий*. – 2023. – Т. 11, №2. – С. 75-82.
- 191 Никишина Т.В., Высоцкая О.Н., Соловьева А.И. и др. Влияние температурных колебаний на жизнеспособность семян при криогенном хранении // *Плодоводство и ягодоводство России: сб.* – М., 2011. – Т. 26. – С. 171-178.
- 192 Воронкова Н.М., Холина А.Б. Биология прорастания и криохранение семян некоторых пищевых и лекарственных видов растений Дальнего Востока России // *Вестник КрасГАУ*. – 2011. – №9. – С. 55-59.
- 193 de Oliveiraa R.A.D. et al. Storage, oil quality and cryopreservation of babassu palm seeds // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – Vol. 91. – P. 332-339.

- 194 Ghaffarzadeh-Namazi L., Babaeian N., Ghamari-zare A. et al. Cryopreservation the seeds of the medicinal plant *Satureja bachtiarica* Bunge // International Journal of Biosciences. – 2015. – Vol. 6, Issue 2. – P. 24-29.
- 195 Додонова А.Ш., Ишмуратова М.Ю., ТлеуKENOVA С.У. Исследование условий криоконсервации семян пижмы улутавской (*Tanacetum ulutavicum*) / Экобиотех. – 2019. – Т. 2, №3. – С. 359-363.
- 196 Ишмуратова М.Ю. Разработка условий криоконсервации семян коровяка лекарственного // Актуальные проблемы современности. – 2019. – №2(24). – С. 169-175.
- 197 Ишмуратова М.Ю., Байгараев Д.Ш. Отработка методов криоконсервации семян *Calendula officinalis* L. // Актуальные проблемы современности. – 2019. – №3(25). – С. 170-175.
- 198 Mukhanova Sh.A., Dodonova A.Sh., Pavlov A.V. Cryopreservation of the seed material of *Achillea ledebourii* // Вестник Карагандинского университета. – 2019. – №1(93). – С. 8-13.
- 199 Tleukenova S.U., Baigarayev D.Sh., Ramazanov A.K. et al. Development of methods of cryopreservation of *Verbascum officinalis*' seeds // Вестник Карагандинского университета. – 2020. – №3(99). – С. 149-154.
- 200 Arystan L.B., Kamsayeva T.Kh., Tleukenova S.U. et al. Effects of carbohydrate content in seeds on the germination and viability after cryopreservation // Вестник Карагандинского университета. – 2021. – №1(101). – С. 6-13.
- 201 Ishmuratova M.Yu., Baigarayev D.S., Ramazanov A.K. et al. Development of cryopreservation methods of seed of *Nepeta cataria* // Вестник Карагандинского университета. – 2021. – №2(102). – С. 37-42.
- 202 Ishmuratova M.Yu. Cryopreservation of seeds of *Nepeta pannonica* // Актуальные проблемы современности. – 2021. – №1(31). – С. 235-240.
- 203 Павлов А.В., Пороховинова Е.А., Брач Н.Б. и др. Влияние криоконсервации в жидком азоте на жизнеспособность семян льна // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – Вып. 184(1). – С. 9-20.
- 204 Graiver N. et al. Partial dehydration and cryopreservation of Citrus seeds // J Sci Food Agric. – 2011. – Vol. 91. – P. 2544-2550.
- 205 Issac M., Kuriakose P., Leung S. et al. Seed Cryopreservation, Germination, and Micropropagation of Eastern Turkeybeard, *Xerophyllum asphodeloides* (L.) Nutt.: A Threatened Species from the Southeastern United States // Plants. – 2021. – Vol. 10. – P. 1462-1-1462-22.
- 206 Ишмуратова М.Ю., ТлеуKENOVA С.У., Гаврилькова Е.А. и др. Криоконсервация семенного материала лекарственных растений: монография. – Караганда, 2023. – 109 с.
- 207 Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A. Vitrification Solutions for Plant Cryopreservation: Modification and Properties. Plants (Basel). 2021 Nov 29;10(12):2623. doi: 10.3390/plants10122623.
- 208 Kihika, J.K., Wood, S.A., Rhodes, L. et al. Cryoprotectant treatment tests on three morphologically diverse marine dinoflagellates and the cryopreservation of

Breviolum sp. (Symbiodiniaceae). Sci Rep 12, 646 (2022).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-04227-2>

209 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.

210 Copeland L.O., McDonald M.B. Seed Vigor and Vigor Tests // In book: Principle of Seed Science and Technology. – NY., 1999. – P. 153-180.

211 Лотова Л.И. Ботаника: морфология и анатомия высших растений. – М.: КомКнига, 2007. – 512 с.

212 Cervantes E., Martin J.J., Saadaoui E. Updated methods for seed shape analysis // Scientifica. – 2016. – Vol. 2016. – P. 5691825.

213 Gabr D.G. Significance of fruit and coat morphology in taxonomy and identification for some species of Brassicaceae // American Journal of Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 380-402.

214 Song J.-H., Moon B.C., Choi G. et al. Morphological identification of lepidii seu descurainiae semen and adulterant seeds using microscopic analysis // Applied science. – 2018. – Vol. 8. – P. 2134-1-2134-13.

215 Hallam N.D. Growth and regeneration of waxes on the leaves of Eucalyptus // Planta. – 1970. – Vol. 93, Issue 3. – P. 257-268.

216 Ray S., Sinhababu A., Tah J. Morphological and micromorphological studies of seeds of ten accessions of Psophocarpus tetragonolobus (L.) DC // Environmental and Experimental Biology. – 2014. – Vol. 12. – P. 101-106.

217 Lubna, Zafar M., Ahmad M. et al. Micromorphological investigation of leaf epidermis and seeds of Vitaceae from Pakistan using light microscopy and scanning electron microscopy // Microsc Res Tech. – 2019. – Vol. 82. – P. 335-344.

218 Bona M. Systematic importance of achene macro-micromorphological characteristics in selected species of the genera Crupina, Jurinea, and Klasea (Asteraceae) from Turkey // Microsc Res Tech. – 2020. – Vol. 93. – P. 1345-1353.

219 Parihar A., Kumar A., Panda U. et al. Cryopreservation: A Comprehensive Overview, Challenges, and Future Perspectives // Adv. Biology. – 2023. – Vol. 7. – P. 2200285.

220 Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) // The Role of Biotechnology. – Villa Gualino, Turin, Italy – March 5-7, 2005. – P. 43-54.  
[https://www.researchgate.net/publication/237472165\\_Status\\_of\\_cryopreservation\\_technologies\\_in\\_plants\\_crops\\_and\\_forest\\_trees](https://www.researchgate.net/publication/237472165_Status_of_cryopreservation_technologies_in_plants_crops_and_forest_trees)

221 Назаренко Л.В. Некоторые особенности криповреждений и криозащиты биологических систем // Вестник МГПУ. Серия: Естественные науки. – 2008. – С. 54-56. <https://cyberleninka.ru/article/n/nekotorye-osobennosti-kriosohraneniya-biologicheskikh-obektov>

222 Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. Current Issues in Plant Cryopreservation. - 2012. Doi: 10.5772/32860.

- 223 Lu J., Greene S., Cruz V.M.V., Dierig D.A., Byrne P. Phenotypic changes and DNA methylation status in cryopreserved seeds of rye (*Secale cereal L.*) // *Cryobiology*. – 2018. – Vol. 83. – P. 1-8. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.04.015
- 224 Johnston J.W., Benson E.E., Harding K. Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2009. – Vol. 47. – P. 123-131. doi:10.1016/j.plaphy.2008.10.008
- 225 Bhattacharya S. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process // In book: *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. – London, 2018. – P. 7-20.
- 226 Fuller B. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state // *Cryo letters*. – 2004. – 25. – Vol. 375-388.
- 227 Wang X., Wang E., Zhao G. Advanced cryopreservation engineering strategies: the critical step to utilize stem cell products // *Cell Regen*. – 2023. – Vol. 12. – P. 28-1-28-14.
- 228 Rajan R., Matsumura K. Development and Application of Cryoprotectants // In book: *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications*. – Singapore: Springer, 2018. – P. 339-354.
- 229 Meneghel J., Kilbride P., Morris G.J. Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies - A Review // *Front. Med*. – 2020. – Vol. 7. – P. 592242.
- 230 Hassan S., Zeng X-A., Khan M.K. et al. Recent developments in physical invigoration techniques to develop sprouts of edible seeds as functional foods // *Front. Sustain. Food Syst*. – 2022. – Vol. 6. – P. 997261.
- 231 Aladjadjiyan A., Kakanakova A. Physical methods in agro-food chain // *J. Cent. Eur. Agric*. – 2009. – Vol. 9. – P. 789-793.
- 232 Oshita S., Boerzhijn S., Kameya H. et al. Promotion Effects of Ultrafine Bubbles/Nanobubbles on Seed Germination // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1677-1-1677-10.
- 233 Purwanto Y.A., Nursafitri M.N., Sobir S. et al. Effect of ultrafine bubbles water on seed germination // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2019. – Vol. 355. – P. 012073.
- 234 Park J.S., Kurata K. Application of microbubbles to hydroponics solution promotes lettuce growth // *HortTechnology*. – 2009. – Vol. 19. – P. 212-215.
- 235 Araújo S.S., Paparella S., Dondi D. et al. Physical Methods for Seed Invigoration: Advantages and Challenges in Seed Technology // *Front. Plant Sci*. – 2016. – Vol. 7. – P. 646-1-646-12.
- 236 Chandana B.C., Nagaveni H.C. et al. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2018. – Vol. SP3. – P. 246-251.
- 237 Sofowora A.E. *Medicinal Plants and Traditional Medicines in Africa*. – Ed. 2nd. – Ibadan, 1993. – 289 p.

238 Zhao Y. et al. Multilayered regulation of secondary metabolism in medicinal plants // Mol Horticulture. – 2023. – Vol. 3. – P. 11-1-11-24.

239 Kulus D. In vitro morphogenesis, cryopreservation and induction of variability in bleeding heart (*Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara): a review // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2024. – Vol. 158. – P. 61-1-61-15.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Криоконсервация семенного материала лекарственных растений: монография

УДК 633.888.632.937.19

**АВТОРЫ:** М.Ю. Ишмурагова, С.У. Глеуконова, Е.А. Газрильцова, А.К. Рамазанов, Р.Т. Мусина

#### РЕЦЕНЗЕНТЫ:

*Мырзахатиева А.Б.* – д.б.н., профессор, первый вице-президент Астана International University.

*Мухомбаева С.К.* – к.б.н., ведущий научный сотрудник Астанинского ботанического сада

*Добекова А.Ш.* – к.б.н., ассоциированный профессор кафедры ботаники НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова»

*Ешмамбетова А.Б.* – к.б.н., ассоциированный профессор кафедры зоологии НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова»

**Криоконсервация семенного материала лекарственных растений.** – Караганда: Изд-во КарУ им. Е.А. Букетова, 2023. - 109 с.

ISBN

Монография посвящена итогам исследования особенностей криоконсервации семенного материала лекарственных растений. Семенной материал лекарственных растений при хранении в традиционных условиях при низких положительных или незначительных отрицательных температурах быстро теряет свою всхожесть, что является малоэффективным для сохранения посевных качеств. В рамках исследования оптимизированы оптимальные тары для хранения семенного материала при температуре сжатого азота, условия заморозки и оттаивания образцов, определена роль криопротекторов и некоторых физических и химических методов активации прорастания семян после депонирования в жидком азоте.

Монография будет представлять интерес для специалистов ботаников, интродукторов, селекционеров, специалистов сельского хозяйства, сотрудников особо охраняемых природных территорий, студентов и преподавателей ВУЗов и колледжей биологических, фармацевтических и сельскохозяйственных направлений.

Монография издается в рамках грантового проекта Комитета науки Министерства науки и высшего образования АР09239548.

ISBN

© М.Ю. Ишмурагова, С.У. Глеуконова,  
Е.А. Газрильцова, А.К. Рамазанов, Р.Т. Мусина, 2023

НАО «КАРАГАНДИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.А. БУКЕТОВА»

Биолого-географический факультет

Кафедра ботаники

Ишмурагова М.Ю., Глеуконова С.У., Газрильцова Е.А.,  
Рамазанов А.К., Мусина Р.Т.

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Монография

Караганда - 2023

# ПРИЛОЖЕНИЕ Б

## Методические рекомендации

Министерство науки и высшего образования  
Республики Казахстан

НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова»

Биолого-географический факультет

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ СОРТОВ «КАРАГАНДИНСКАЯ», «ПОДМОСКОВНАЯ», «АЙБОЛИТ» И «СТАРЫЙ ЛЕКАРЬ»

Рамазанов А.К., Тлеуженова С.У.



Караганда 2023

УДК 581.2:582.666:631.8

ББК

К

#### Рецензенты:

Ишмурадова М.Ю. – к.б.н., профессор-исследователь кафедры ботаники  
НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова»

Аджибаева С.Н. – к.б.н., ассоциированный профессор кафедры экологии и  
туризма Университета «Туран-Астана»

#### Рекомендовано:

Советом биолого-географического факультета НАО «Карагандинский  
университет имени академика Е.А. Букетова» (протокол № от ..... 2023 г.)

Рекомендации по криоконсервации семенного материала ромашки  
аптечной. Изд-во Карагандинский университет имени академика Е.А.  
Букетова / А.К. Рамазанов, С.У. Тлеуженова. – Караганда: Изд-во КарУ им.  
Е.А. Букетова, 2023. – 21 с.

ISBN

В рекомендациях представлены результаты исследований по оптимизации  
условий криоконсервации семенного материала лекарственного растения  
ромашки аптечной. Семенной материал ромашки аптечной при хранении в  
традиционных условиях в течение нескольких лет теряет свою всхожесть, что  
является не эффективным для сохранения посевных качеств. Выявлен  
оптимальный метод размораживания семян после криоконсервации в жидком  
азоте. Установлено, что лучший способ оттаивания – медленный при  
комнатной температуре 20-22 °С.

Рекомендации рассчитаны на научных сотрудников, ботаников,  
специалистов в области семеноводства лекарственных растений,  
преподавателей и студентов ВУЗов. Исследования выполнены в рамках  
грантового проекта AP09259548.

ISBN

© Карагандинский университет имени академика Е.А.

Букетова

© Рамазанов А.К., Тлеуженова С.У., 2023

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Справка и сертификат о повышении квалификации по криоконсервации семян лекарственных растений

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ  
**«ӨСІМДІКТЕР БИОЛОГИЯСЫ ЖӘНЕ  
БИОТЕХНОЛОГИЯСЫ ИНСТИТУТЫ»**  
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ  
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ  
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ

050040, Алматы қаласы, Тимирязев көшесі, 45  
тел./факс: 8 (727) 394-75-62, 394-75-54  
E-mail: ipbb\_kz@yahoo.com



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ  
РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ  
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ  
**«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ»**

050040, город Алматы, улица Тимирязева, 45  
тел./факс: 8 (727) 394-75-62, 394-75-54  
E-mail: ipbb\_kz@yahoo.com

№ 181/10

01.07.2021

#### СПРАВКА

Настоящей справкой удостоверяется, что докторант биолого-географического факультета НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова» **Рамазанов Алибек Кайриденович** с 28 июня по 02 июля 2021 г. прошел теоретический и практический курс по теме: «**Освоение методов криоконсервации семян лекарственных растений**» в объеме 40 часов в лаборатории криосохранения гермоплазмы РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН Республики Казахстан.

Генеральный директор ИББР  
д.б.н. академик НАН РК



Жамбакин К.Ж.

Исп. Ромаданова Н.В.  
Тел. +7 727 385 75 78

000009

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine

# CERTIFICATE

this is to certify that PhD student in specialty of «6D060700 – Biology»

**RAMAZANOV  
ALIBEK KAIRIDENOVICH**

completed the internship program, titled as

**«MASTERING OF PLANT CRYOPRESERVATION  
TECHNIQUES»**

(120 hours)

March, 1<sup>st</sup> – April, 1<sup>st</sup>



Director of the IPC&C of the National Academy  
of Sciences of Ukraine  
Academician of the NAS of Ukraine  
Prof. Anatoliy Goltsev

Advisor, senior researcher of  
phytocryobiology laboratory  
Dr. Nadiia Shevchenko

Kharkiv, 2021

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Акты внедрения итогов диссертационной работы

СОГЛАСОВАНО

Член Правления - Проректор по научной работе НАО «КарУ им. академика Е.А. Букетова», д.х.н., профессор  
  
Е.М. Тажбаев  
«15» 03 2023 г.

УТВЕРЖДАЮ

Декан биолого-географического факультета НАО «КарУ им. академика Е.А. Букетова», к.г.н., асп. профессор  
  
С.А. Талжанов  
«15» 03 2023 г.

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы в деятельность организации

Мы, ниже подписавшиеся, представители исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга биолого-географического факультета и Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова составили настоящий Акт о том, что «Рекомендации по криоконсервации семенного материала ромашки аптечной сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» авторов Рамазанов А.К., Тлеуенова С.У. внедрены в научный процесс для организации криобанка семенного материала лекарственных растений на базе исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга в рамках грантового проекта Министерство науки и высшего образования РК AP09259548 «Криоконсервация семенного материала дикорастущих и лекарственных растений и организация банка краткосрочного и долгосрочного хранения».

Директор Департамента науки

  
С.С. Касымов  
«15» 03 2023 г.

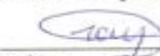
Исполнитель:

  
С.У. Тлеуенова  
«15» 03 2023 г.

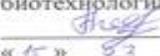
Исполнитель:

  
А.К. Рамазанов  
«15» 03 2023 г.

Руководитель Исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга

  
М.Ю. Ишмуратова  
«15» 03 2023 г.

Младший научный сотрудник Исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга

  
Д.В. Агеев  
«15» 03 2023 г.

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Декан биолого-географического  
факультета НАО «КарУ им.  
академика Е.А. Букетова», к.г.н.,  
ассоц. профессор

Генеральный директор РГП на ПХВ  
«Алтайский ботанический сад»  
МТВО РК



С.А. Талжанбаев

А.А. Сумбембаев

«15» 03 2023 г.

«15» 03 2023 г.

**АКТ**

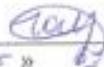
внедрения результатов научно-исследовательской работы в  
деятельность организации

Мы, ниже подписавшиеся, представители биолого-географического факультета Карагандинского университета им. академика Е.А. Букетова составили настоящий Акт о том, что «Рекомендации по криоконсервации семенного материала ромашки аптечной сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь» авторов Рамазанова А.К., Тлеукуновой С.У., подготовленные в рамках грантового проекта Министерство науки и высшего образования РК AP09259548 «Криоконсервация семенного материала дикорастущих и лекарственных растений и организация банка краткосрочного и долгосрочного хранения», внедрены в научный процесс для организации работы семенного банка растений Алтайского ботанического сада.

Исполнитель:

Руководитель грантового проекта

  
С.У. Тлеукунова  
«15» 03 2023 г.

  
М.Ю. Ишмуратова  
«15» 03 2023 г.

Исполнитель:

  
А.К.Рамазанов  
«15» 03 2023 г.

Старший научный сотрудник  
Исследовательского парка  
биотехнологии и экомониторинга  
  
М.К. Смагулов  
«15» 03 2023 г.

**УТВЕРЖДАЮ**  
Декан биолого-географического  
факультета КэрУ им. Е.А. Букетова  
 С.А. Талжанов  
«14» 10 2021 г.



**АКТ**

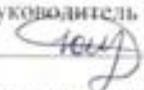
о внедрении результатов НИР в учебный процесс, деятельность организаций  
и предприятий

Мы, нижеподписавшиеся, представители НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова» составили настоящий акт о том, что итоги диссертационной работы Рамазанова А.К. «Криоконсервация семенного материала сортов ромашки аптечной и разработка методов краткосрочного и долгосрочного хранения» внедрены в учебный процесс по дисциплине «Криобиология» для студентов бакалавриата специальности 6В05102 – Биотехнология.

Использование результатов позволяет:

- 1 Повысить уровень подготовки студентов очного отделения.
- 2 Разработать практические и лабораторные работы по дисциплине «Криобиология» с учетом методической базы и итогов исследований.
- 3 Использовать результаты для подготовки дипломных работ по криоконсервации семян лекарственных растений.

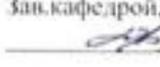
**От исследовательского парка  
биотехнологии и экомониторинга:**

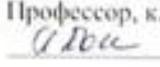
Руководитель парка, к.б.н.  
 М.Ю. Ишмуратова

Старший научный сотрудник, к.б.н.  
 М.К. Смагулов

Научный сотрудник.  
 А.К. Рамазанов

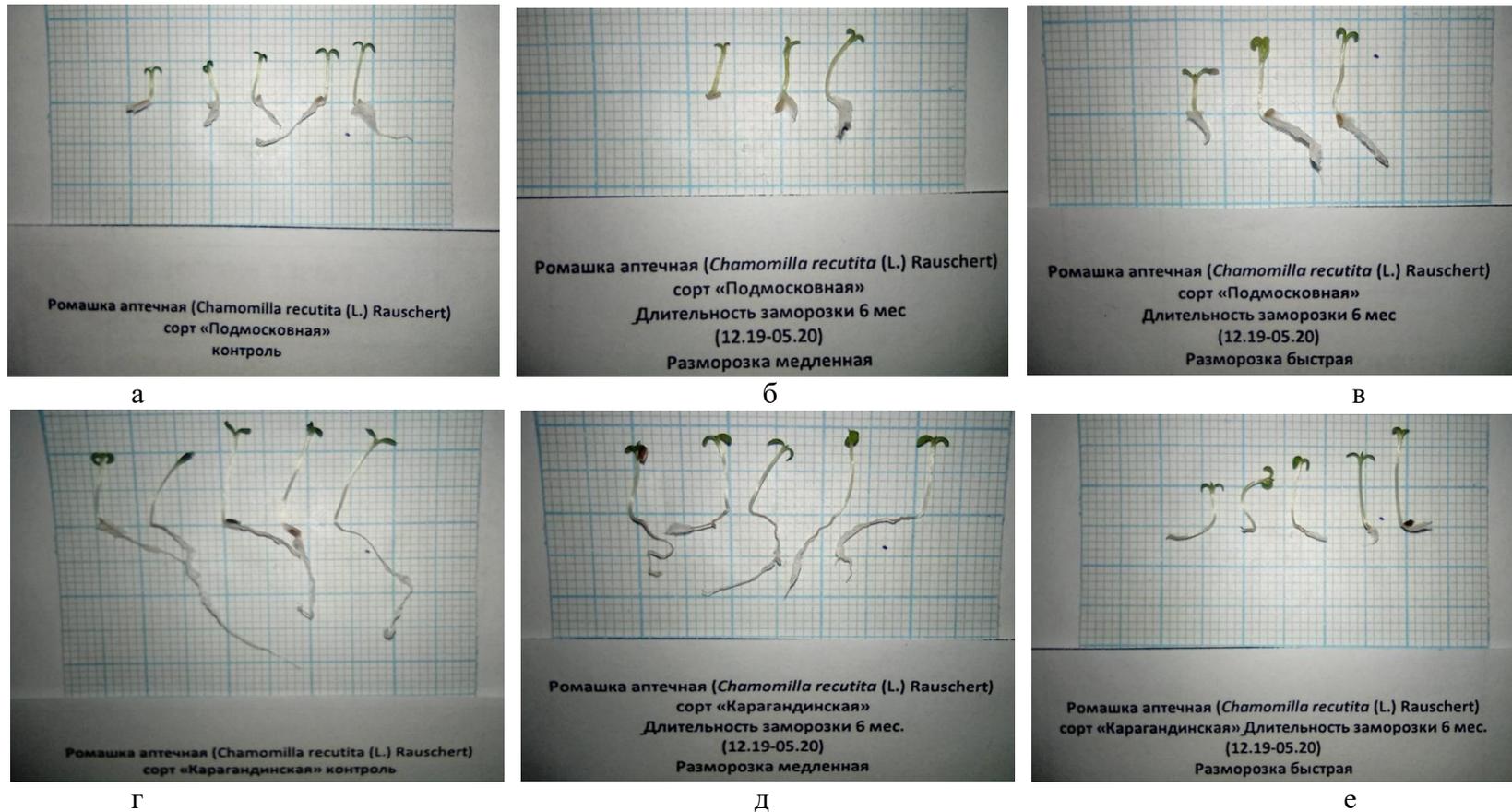
**От кафедры ботаники:**

Зав.кафедрой, к.б.н.  
 А.К. Луельбекова

Профессор, к.б.н.  
 Г.Н. Погосян

Ассоциированный профессор, к.б.н.  
 С.У. Тлеукунова

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д



а – сорт Подмосковная - контроль; б – сорт Подмосковная - медленное размораживание; в – сорт Подмосковная - быстрое размораживание; г – сорт Карагандинская - контроль; д – сорт Карагандинская - медленное размораживание; е – сорт Карагандинская - быстрое размораживание

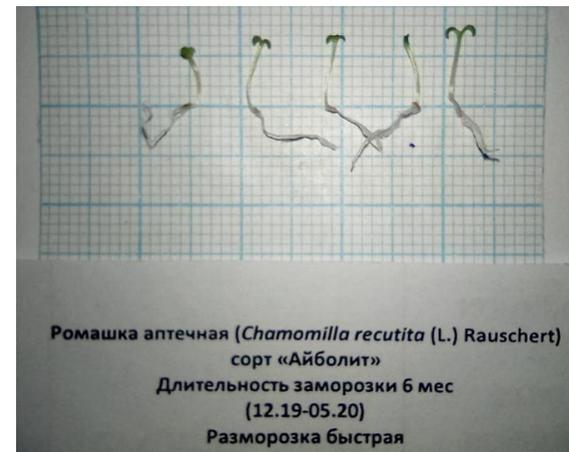
Рисунок Д.1 – Внешний вид проростков сортов *Chamomilla recutita* при оптимизации условий размораживания после криоконсервации, лист 1



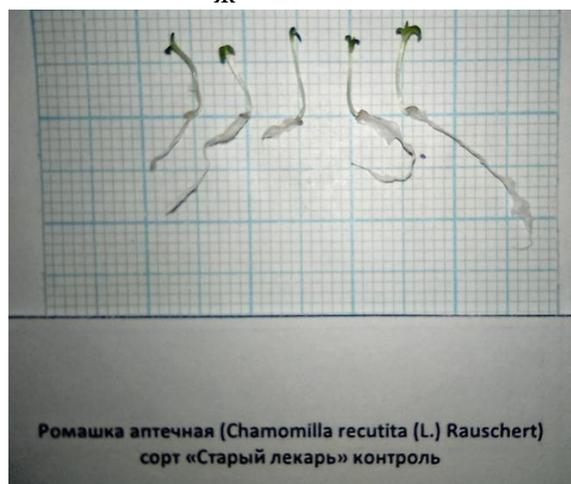
Ж



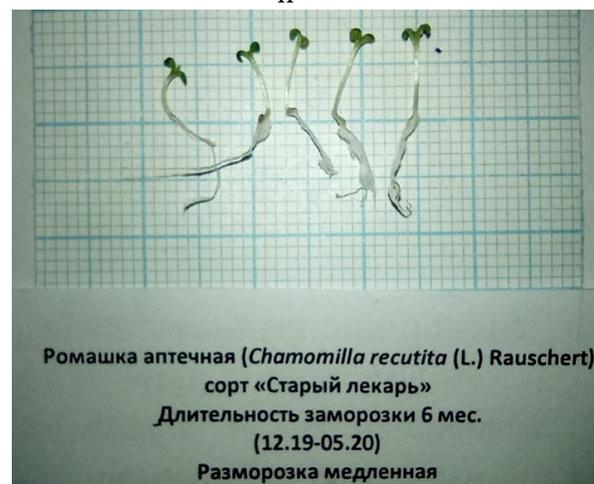
И



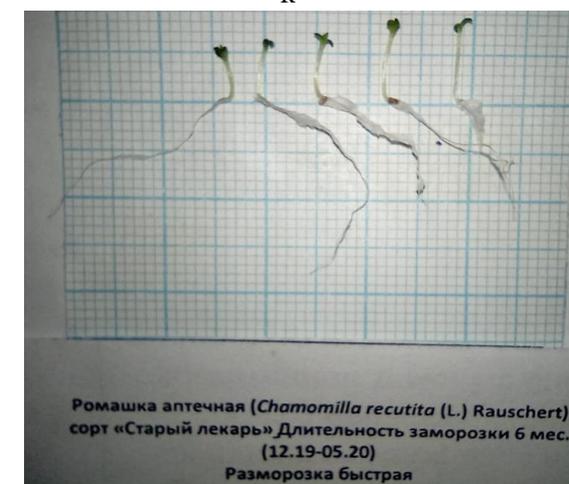
К



Л



М



Н

ж – Сорт Айболит - контроль; и – Сорт Айболит - медленное размораживание; к – Сорт Айболит - быстрое размораживание; л – Сорт Старый лекарь - контроль; м – Сорт Старый лекарь - медленное размораживание; н – Сорт Старый лекарь - быстрое размораживание

Рисунок Д.1, лист 2

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е



а



б

а – *Chamomilla recutita*, сорт Подмосковная; б – *Chamomilla recutita*, сорт Карагандинская

Рисунок Е.1 – Определение количественного и качественного состава эфирных масел из надземной части сортов *Chamomilla recutita*, выращенных из предварительно криоконсервированных семян, лист 1



В



Г

в – сбор и сушка надземной части сортов *Chamomilla recutita*, выращенных из семян хранившихся в жидком азоте; г – подготовка надземной части сортов *Chamomilla recutita* к выделению эфирного масла

Рисунок Е.2, лист 2



д



е

д – выделение эфирных масел из сортов *Chamomilla recutita* на аппарате Клевенджера;  
е – определение компонентного состава эфирных масел сортов *Chamomilla recutita* на газовом хроматографе Clarus-SQ 8 с масс-спектрометрическим детектором

Рисунок Е.3, лист 3

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

### Состав эфирного масла сортов *Ch. recutita*

Таблица Ж.1 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Карагандинская, вариант - контроль (без криообработки)

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
1	2	3	4	5	6
18.443	1037±7	1040	$\beta$ - <i>cis</i> -Ocimene	940	0.4
28.723	1166±7	1162	Borneol	905	0.3
29.515	1177±2	1171	Terpinen-4-ol	878	0.2
39.12	1297	1284	<i>trans</i> -Sabinyl acetate	903	0.5
42.238	1344±N/A	1322	Elemene isomer	922	0.3
46.497	1386±6	1372	Isocomene	909	0.2
49.124	1403±1	1403	$\alpha$ -Ylangene	842	0.3
52.796	1444±3	1445	( <i>E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	928	3.6
53.651	1449±2	1454	$\alpha$ -Himachalene	793	0.3
54.286	1481±3	1462	<i>Germacrene D</i>	926	8.3
54.693	1491±2	1466	<i>trans</i> - $\alpha$ -Ionone	904	0.4
55.434	1495±4	1475	<i>Bicyclogermacren</i>	916	5.8
55.823	1491±3	1479	<i>cis,trans</i> - $\alpha$ -Farnesene	938	3.0
57.14	1508±2	1494	$\alpha$ -Farnesene	947	26.5
57.437	1524±2	1497	$\delta$ -Cadinene	824	0.4
58.817	1536±N/A	1517	Laciniatafuranone F	749	0.3
60.302	1581±2	1538	Caryophyllene oxide	732	0.3
60.864	1588±13	1547	Davanone	737	0.3
61.271	1544±16	1552	Nerolidol	807	0.2
61.851	1576±2	1561	<i>Spathulenol</i>	922	6.9
62.247	1586±5	1567	$\beta$ -Copaen-4 $\alpha$ -ol	790	0.3
62.914	1581±2	1577	Caryophyllene oxide	779	0.4
63.223	1581±N/A	1581	1-Isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethylsuccinate	758	0.4
63.685	1565±4	1588	Ledol	839	0.2
64.03	1589±10	1593	Isoaromadendrene epoxide	853	0.3
64.774	1599 iu	1604	Tricyclo[5.2.2.0(1,6)]undecan-3-ol, 2-methylene-6,8,8-trimethyl-	807	0.2
65.67	1763±3	1617	<i>cis</i> , $\alpha$ -Santalol	825	0.2
66.022	1638±5	1622	Isospathulenol	863	0.8
67.097	1678±N/A	1638	Aromadendrene oxide-(2)	825	0.3
67.673	1655±3	1646	$\alpha$ -Bisabolol oxide B	848	1.5
68.564	1631±N/A	1659	Ledene oxide-(II)	819	0.4
69.492	1679±N/A	1673	<i>Bisabolone oxide A</i>	798	5.6
69.716	1695±N/A	1676	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\beta$ -ol	873	0.2
70.138	1684±3	1682	$\alpha$ -Bisabolol	878	1.9
72.435	1725±8	1716	<i>Chamazulene</i>	947	3.6
74.199	1744±9	1742	<i>Bisabolol oxide I</i>	929	3.2
79.922		1826	<i>Unknown 1</i>		0.3
83.118	1849±42	1872	<i>cis-ene-yne-Dicycloether</i>	916	4.5

Продолжение таблицы Ж.1

1	2	3	4	5	6
84.735		1896	<i>Unknown 2</i>		0.3
87.487	1961±N/A	1936	( <i>E</i> )-Tibetinspiroether	955	0.9
88.202	1965±6	1947	Dibutyl phthalate	771	0.2
98.027	2114±5	2104	Phytol	920	1.2
110.188	2500	2504	Pentacosane	864	0.3
111.92	2700	2686	Heptacosane	860	0.2
<i>Total</i>					85.9

Таблица Ж.2 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Карагандинская, вариант - криоконсервация длительностью 1 час

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
14.089	986±2	981	6-Methyl-5-heptene-2-one	860	0.6
17.599	1049±2	1029	$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	934	0.3
18.062	1045±4	1035	Benzeneacetaldehyde	943	0.2
18.399	1037±7	1040	Ocimene	934	2.0
42.224	1344±N/A	1322	Elemene isomer	918	0.3
42.752		1328	<i>Unknown 1</i>		0.6
49.113	1419±3	1403	$\beta$ -Caryophyllen	853	0.2
52.749	1457±2	1444	$\beta$ - <i>trans</i> -Farnesene	930	4.3
54.205	1481±3	1461	Germacrene D	927	6.5
54.653	1491±2	1466	<i>trans</i> - $\alpha$ -Ionone	910	0.4
55.394	1495±4	1474	Bicyclogermacren	911	5.4
55.79	1491±3	1479	( <i>Z,E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	940	2.5
57.034	1508±2	1493	$\alpha$ -Farnesene	949	22.9
57.39	1524±2	1497	Cadina-1(10),4-diene	814	0.2
58.788	1564±4	1516	Nerolidol	783	0.2
61.8	1576±2	1560	Spathulenol	927	8.0
62.218	1576±2	1566	Espatulenol	818	0.4
62.867	1562±N/A	1576	6,10-Dodecadien-1-yn-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	775	0.3
63.234	1588±N/A	1581	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	823	0.4
63.678	1565±4	1588	Ledol	853	0.2
64.012	1581±2	1593	Caryophyllene oxide	816	0.2
66.004	1638±5	1622	Isospathulenol	861	0.9
67.093	1695±N/A	1638	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\beta$ -ol	821	0.2
67.644	1655±3	1646	$\alpha$ -Bisabolol oxide B	845	1.2
68.539	1631±N/A	1659	7-Hydroxyfarnesen	810	0.4
68.869	1631±N/A	1664	Ledene oxide-(II)	812	0.2
69.452	1700±8	1672	$\alpha$ - <i>trans</i> -Bergamotenol	756	3.8
70.138	1684±3	1682	Bisabolol	906	3.9
72.365	1725±8	1715	Chamazulene	949	2.3
74.145	1744±9	1741	Bisabolol oxide A	926	2.7
79.923	1836 iu	1826	1,4-Dimethoxy-6,7,8,9-tetrahydro-5-benzocycloheptenone	685	0.9
83.1	1849±42	1872	<i>cis-ene-yne</i> -Dicycloether	917	6.3
84.013	1902±N/A	1886	( <i>E</i> )-en-yn-Dicycloether	790	0.2

Продолжение таблицы Ж.2

1	2	3	4	5	6
84.725		1896	<i>Unknown 2</i>		0.4
87.476	1961±N/A	1936	( <i>E</i> )-Tibetinspiroether	952	1.0
98.031	2114±5	2104	Phytol	918	1.2
107.474		2338	<i>Unknown 3</i>		0.2
109.096	2400	2397	Tetracosane	919	0.3
110.185	2281±8	2504	Heptacosane	843	0.7
110.446	2543±3	2531	Diisooctyl phthalate	935	0.4
111.048	2600	2593	Hexacosane	911	0.5
111.917	2700	2685	Heptacosane	922	0.7
112.886	2800	2789	Octacosane	914	0.4
115.314	3000	2987	Tricontane	897	0.3
116.91	3100	3079	Hentriacontane	791	0.2
<i>Total</i>					85.4

Таблица Ж.3 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Карагандинская, вариант - криоконсервация длительностью 3 часа

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
1	2	3	4	5	6
4.855	800±2	797	Hexanal	906	0.4
13.931	986±2	978	6-Methyl-5-heptene-2-one	899	1.6
14.136	993±2	981	2- <i>n</i> -Pentylfuran	896	0.3
18.37	1038±2	1039	$\beta$ - <i>cis</i> -Ocimene	929	0.4
19.357	1062±1	1052	Artemisia ketone	883	0.5
42.558		1325	<i>Unknown 1</i>		0.3
46.487	1386±6	1372	Isocomene	903	0.6
52.856	1457±2	1445	( <i>E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	928	11.6
54.177	1481±3	1460	<i>Germacrene D</i>	927	1.9
54.455	1491±2	1463	$\beta$ -Ionone	905	0.5
55.34	1495±4	1473	<i>Bicyclgermacren</i>	904	1.8
55.747	1491±3	1478	( <i>Z,E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	927	0.9
56.895	1508±2	1491	$\alpha$ -Farnesene	940	7.0
57.412		1497	<i>Unknown 2</i>		0.3
58.693	1544±16	1515	Nerolidol	807	0.4
60.388		1540	<i>Unknown 3</i>		0.4
60.766	1573±4	1545	1,5-Epoxyisoval-4(14)-ene	844	0.2
61.147	1763±3	1551	<i>cis</i> -Lanceol	802	0.8
61.796	1576±2	1560	<i>Spathulenol</i>	937	12.4
62.152	1577±5	1565	Ent-Spathulenol	848	0.5
62.688	1595±4	1573	Mintketone	796	0.5
63.069	1581±N/A	1579	Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	721	0.4
63.561	1589±10	1586	Isoaromadendrene epoxide	824	0.3
63.965	1581±2	1592	Caryophyllene oxide	819	0.4
64.691	1599 iu	1603	Tricyclo[5.2.2.0(1,6)]undecan-3-ol, 2-methylene-6,8,8-trimethyl-	831	0.3

Продолжение таблицы Ж.3

1	2	3	4	5	6
64.863	1581±2	1605	Caryophyllene oxide	811	0.3
65.113	1562±N/A	1609	Deca-4,8-dienol, 1-ethynyl-1,5,9-trimethyl-	795	0.4
65.909	1638±5	1620	Isospathulenol	870	0.9
66.078	1700±8	1623	$\alpha$ -trans-Bergamotenol	759	0.3
67.061	1695±N/A	1637	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\beta$ -ol	766	0.3
67.564	1655±3	1645	$\alpha$ -Bisabolol oxide B	910	2.5
67.699	1655±3	1647	Bisabolol oxide II	881	0.3
68.473	1672±N/A	1658	Aromadendrene oxide-(1)	793	0.4
68.84	1631±N/A	1663	Ledene oxide-(II)	793	0.3
69.394	1679±N/A	1671	$\alpha$ -Bisabolol oxide B	812	5.0
70.058	1684±3	1681	$\alpha$ -Bisabolol	886	3.8
72.414	1725±8	1716	Chamazulene	936	4.1
74.12	1744±9	1741	Bisabolol oxide A	925	4.2
79.846		1825	Unknown 4		0.6
83.156	1849±42	1873	cis-ene-yne-Dicycloether	920	10.3
83.944	1902±N/A	1885	(E)-en-yn-Dicycloether	832	0.3
84.685		1895	Unknown 5		0.4
85.493	1926±N/A	1907	(Z)-Tibetinspiroether	859	0.3
87.448	1961±N/A	1936	(E)-Tibetinspiroether	958	1.5
89.646	1968±7	1968	n-Hexadecanoic acid	907	1.0
97.992	2114±5	2104	trans-Phytol	919	1.4
110.121	2493±19	2497	1-Docosanol	908	0.2
110.183	2500	2504	n-Pentacosane	914	0.4
111.915	2693±1	2682	Heptacos-1-ene	848	0.9
113.987	2900	2880	n-Octacosane	907	0.3
<i>Total</i>					85.1

Таблица Ж.4 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Подмосковная, вариант - контроль (без криообработки)

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
1	2	3	4	5	6
14.063	986±2	980	6-Methyl-5-heptene-2-one	855	1.1
17.284	1032±2	1025	1.8-Cineol	930	0.2
18.385	1037±7	1040	Ocimene	940	1.3
19.478	1062±1	1054	Artemesia ketone	891	0.5
42.73		1328	Unknown 1		0.5
46.486	1386±6	1372	Isocomene	914	0.4
52.701	1457±2	1444	(E)- $\beta$ -Farnesene	925	2.1
54.176	1481±3	1460	Germacrene D	927	3.5
54.642	1491±2	1466	$\beta$ -Ionone	893	0.5
55.346	1495±4	1474	Bicyclogermacren	913	3.0
55.775	1491±3	1478	cis,trans- $\alpha$ -Farnesene	936	1.6
56.949	1508±2	1492	$\alpha$ -Farnesene	946	13.8
57.346	1524±2	1496	$\delta$ -Cadinene	783	0.2

Продолжение таблицы Ж.4

1	2	3	4	5	6
57.566		1499	<i>Unknown 2</i>		0.3
60.013	1553±4	1534	Sesquirosefuran	878	0.3
61.81	1576±2	1560	<i>Spathulenol</i>	931	8.3
62.229	1577±5	1567	Ent-Spathulenol	845	0.5
62.863	1562±N/A	1576	Deca-4,8-dienol, 1-ethynyl-1,5,9-trimethyl-	788	0.4
63.208	1589±10	1581	Isoaromadendrene epoxide	687	0.2
63.674	1565±4	1588	Globulol	834	0.2
64.03	1581±2	1593	Caryophyllene oxide	839	0.2
65.725	1624±N/A	1618	<i>E</i> -Farnesene epoxide,	807	0.2
66.011	1638±5	1622	Isospathulenol	907	0.8
67.849	1655±3	1649	<i>α</i> -Bisabolol oxide B	943	15.7
68.513	1631±N/A	1659	Ledene oxide-(II)	845	0.2
68.895	1690±0	1664	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	789	0.2
69.405	1700±8	1672	( <i>Z</i> )- <i>α</i> -trans-Bergamotol	764	1.9
69.68	1695±N/A	1676	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol	893	0.3
70.036		1681	<i>Unknown 3</i>		0.4
72.405	1725±8	1716	<i>Chamazulene</i>	944	3.0
74.148	1744±9	1741	<i>α</i> -Bisabolol oxide A	931	2.6
79.923		1826	<i>Unknown 4</i>		0.5
81.346	1844±4	1846	Perhydrofarnesyl acetone	907	0.2
83.177	1849±42	1873	<i>cis-ene-yne-Dicycloether</i>	919	9.0
84.743		1896	<i>Unknown 5</i>		0.3
87.487	1961±N/A	1936	( <i>E</i> )-Tibetinspiroether	957	1.1
98.035	2114±5	2104	Phytol	927	0.7
110.453	2543±3	2531	Diisooctyl phthalate	939	0.9
111.924	2700	2686	Heptacosane	901	0.3
<i>Total</i>					78.3

Таблица Ж.5 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Подмосковная, вариант - криоконсервация длительностью 1 час

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
1	2	3	4	5	6
14.129	986±2	981	6-Methyl-5-heptene-2-one	899	0.8
18.421	1037±7	1040	β-Ocimene	942	1.1
42.245	1344±N/A	1322	Elemene isomer	925	0.3
42.748	1395 iu	1328	1,2-Dioxaspiro[4.5]decan-3-one, 4-methylene-	731	0.4
46.497	1386±6	1372	<i>α</i> -Isocomene	919	0.6
49.121	1419±3	1403	Caryophyllene	866	0.3
52.342	1440±1	1440	Aromandendrene	852	0.3
52.708	1457±2	1444	β- <i>trans</i> -Farnesene	924	1.5

Продолжение таблицы Ж.5

1	2	3	4	5	6
54.198	1481±3	1461	<i>Germacrene D</i>	927	5.9
54.649	1491±2	1466	$\beta$ -Ionone	909	0.5
55.372	1495±4	1474	<i>Bicyclogermacren</i>	914	5.0
55.805	1491±3	1479	<i>cis,trans-<math>\alpha</math>-Farnesene</i>	936	3.0
57.049	1508±2	1493	<i><math>\alpha</math>-Farnesene</i>	946	25.2
58.512		1512	<i>Unknown 1</i>		0.2
58.791	1564±4	1516	Nerolidol	780	0.4
60.005	1553±4	1534	Sesquirosefuran	925	0.3
60.457		1541	<i>Unknown 2</i>		0.2
61.854	1576±2	1561	<i>Spathulenol</i>	931	12.3
62.24	1577±5	1567	<i>ent</i> -Spathulenol	829	1.0
62.893	1573±4	1576	1,5-Epoxysalvial-4(14)-ene	794	0.5
63.215	1581±N/A	1581	Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	651	0.3
63.681	1565±4	1588	Ledol	844	0.3
64.045	1581±2	1593	Caryophyllene oxide	859	0.4
64.767	1631±N/A	1604	Ledene oxide-(II)	786	0.2
64.958		1606	<i>Unknown 3</i>		0.2
65.648	1624±N/A	1617	<i>E</i> -Farnesene epoxide	802	0.3
66.004	1638±5	1622	Isospathulenol	867	1.2
66.792	1692±12	1633	Aristol-1(10)-en-9-ol	814	0.2
67.086	1678±N/A	1638	Aromadendrene oxide-(2)	828	0.3
67.647		1646	<i>Unknown 4</i>		1.1
68.341		1656	<i>Unknown 5</i>		0.2
68.517	1688±2	1659	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	787	0.6
68.869	1690±0	1664	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	802	0.3
69.427		1672	<i>Unknown 6</i>		2.8
69.665	1695±N/A	1675	<i>ent</i> -Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\beta$ -ol	902	0.3
70.058	1684±3	1681	<i><math>\alpha</math>-Bisabolol</i>	824	1.4
72.332	1725±8	1714	<i>Chamazulene</i>	939	0.5
74.115	1744±9	1741	<i>Bisabolol oxide A</i>	911	0.7
79.926	1836 iu	1826	1,4-Dimethoxy-6,7,8,9-tetrahydro-5-benzocycloheptenone	691	0.8
81.335	1844±4	1846	Hexahydrofarnesyl acetone	914	0.4
83.118	1849±42	1872	<i>cis-ene-yne-Dicycloether</i>	912	7.3
84.729		1896	<i>Unknown 7</i>		0.4
87.495	1961±N/A	1937	( <i>E</i> )-Tibetinspiroether	954	1.5
88.192	1965±6	1947	Dibutyl phthalate	914	0.2
98.038	2114±5	2104	Phytol	922	1.5
110.45	2543±3	2531	Diisooctyl phthalate	943	0.5
<i>Total</i>					83.7

Таблица Ж.6 – Состав эфирного масла *Ch. recutita*, сорта Подмосковная, вариант - криоконсервация длительностью 3 часа

RT	Rlit	Rcalc	Component	Match	Area %
4.844	800±2	797	Hexanal	945	0.7
13.061	979±2	965	β-Pinene	946	0.6
13.909	986±2	978	6-Methyl-5-heptene-2-one	892	1.8
14.136	993±2	981	2-Pentylfuran	842	0.4
15.141	1005±2	997	α-Fellandrene	935	5.1
16.477	1022±2	1015	o-Isopropyltoluene	928	1.0
16.851	1027±3	1020	m-Mentha-6,8-diene	856	1.3
17.09	1032±2	1023	1.8-Cineole	927	0.8
18.37	1049±2	1039	trans-a-Ocimene	924	0.5
27.461	1160±3	1148	trans-Pinocamphone	929	0.6
27.644	1164±N/A	1150	α-Pinocarvone	903	2.6
28.738	1173±2	1162	Isocamphopinone	892	0.4
46.501	1386±6	1372	Isopinocamphon	901	1.0
49.025	1449±2	1402	α-Himachalene	838	0.5
52.69	1444±3	1444	β-cis-Farnesene	924	1.9
54.143	1481±3	1460	Germacrene D	928	2.2
54.437	1491±2	1463	β-Ionone	923	0.4
55.317	1495±4	1473	Bicyclogermacren	902	1.7
55.75	1491±3	1478	(Z,E)-α-Farnesene	922	1.0
56.884	1491±3	1491	α-Farnesene	938	8.1
58.696	1564±4	1515	Nerolidol	790	0.4
61.767	1576±2	1560	Spathulenol	934	15.3
62.145	1577±2	1565	ent-Spathulenol	851	0.8
62.684	1595±4	1573	Mintketone	782	0.4
63.073	1581±N/A	1579	1-Isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethylsuccinate	740	0.5
63.561	1589±10	1586	Isoaromadendrene epoxide	810	0.4
63.953	1581±2	1592	Caryophyllene oxide	790	0.4
65.087		1608	Unknown 1		1.1
65.538	1624±N/A	1615	α-trans-Bergamotenol	790	0.4
65.905	1638±5	1620	Isospathulenol	865	1.1
67.505	1642±2	1644	Muurolol T	913	0.5
67.659		1646	Unknown 2		0.4
68.433		1657	Unknown 3		0.5
68.811	1690±0	1663	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-2-naphthalenol	801	0.4
69.332	1688±2	1671	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	786	2.0
69.577	1695±N/A	1674	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol	908	0.5
69.981		1680	Unknown 4		0.5
79.846		1825	Unknown 5		0.8
81.262	1844±4	1845	Hexahydrofarnesyl acetone	906	0.8
82.062	1870±4	1857	Phthalic acid, diisobutyl ester	879	0.4
83.038	1849±42	1871	cis-ene-yne-Dicycloether	912	7.1
84.67		1895	Unknown 6		0.5
87.411	1961±N/A	1935	(E)-Tibetinspiroether	945	1.5
88.082	1965±6	1945	n-Butyl phthalate	918	0.4
89.663	1968±7	1968	Hexadecanoic acid	906	1.5
97.999	2114±5	2104	Phytol	915	2.0
111.932		2687	Unknown 7		0.7
Total					73.9