DOI 10.31489/2022BMG3/42-46

УДК 57.033

А.Ш. Додонова*, Д.Д. Антипова

Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан
**Автор для корреспонденции: sasha_dodonova1@mail.ru*

Изучение влияния способа внесения криопротекторов на сохранение семенного материала мяты длиннолистной при криоконсервации

Представленная статья посвящена оптимизации условий криохранения семенного материала мяты длиннолистной. Мята длиннолистная — эфиромасличное растение, активно применяемое в парфюмерной, фармацевтической и пищевой промышленности. В экспериментах по криохранению использованы следующие эндоцеллюлярные и экзоцеллюлярные криопротекторы: поливинилпирролидон (ПВП), глицерин и диметисульфоксид (ДМСО). Кроме того, исследовано влияние на сохранение ростовых характеристик семян при криоконсервации способа внесения криопротектора: при комнатной температуре и на ледяной бане. Исходная всхожесть семян мяты длиннолистной составила 76,3±2 %, а энергия прорастания — 70,3±1,8 %. При замораживании в жидком азоте без применения криопротекторов всхожесть составила 64,9±0,8 %, а энергия прорастания — 18,95±0,2 %. Следует отметить, что именно показатель энергии прорастания оказался чувствительным к депонированию семенного материала при экстремально низких температурах. Анализ результатов сохранения жизнеспособности семян мяты длиннолистной при замораживании их в криопротекторах различного состава в случае внесения их при комнатной температуре показал, что тенденция резкого снижения энергии прорастания наблюдается во всех вариантах эксперимента. Наилучшими вариантами криопротекторов для сохранения ростовых характеристик семенного материала оказались ДМСО 2,5 % и ПВП 3 %, вносимые на ледяной бане. Всхожесть семян, сохраняемых в этих криопротекторах, составила 85,8±3,1 % и 87,6±2,3 % соответственно. Таким образом, выявлено, что оптимальным способом внесения криопротекторов при криоконсервации семян мяты длиннолистной является температура, близкая к 0°С, в этом случае серьезно повышается как всхожесть, так и энергия прорастания семян.

Ключевые слова: криохранение, криоконсервация, криопротектор, семенной материал, мята длиннолистная, всхожесть, энергия прорастания, ледяная баня.

Введение

Сокращение биологического разнообразия — одна из глобальных проблем современности. Переоценить негативные последствия исчезновения любого вида сложно. В настоящее время существует множество методов, позволяющих сохранять гермоплазму. Простым и в то же время эффективным методом сохранения семенного материала является криоконсервация. Этот метод в случае оптимизации условий замораживания, отогрева, состава криопротекторов позволяет сохранять жизнеспособность биологического материала практически на 100 % в течение неограниченного времени. Следует отметить, что влияние на сохранение жизнеспособности биологического объекта оказывают и температура внесения криопротектора, и скорость замораживания, и способ отогрева [1, 2].

Цель нашего исследования — сравнение сохранения ростовых показателей семенного материала мяты длиннолистной при криохранении в случае применения разных способов внесения криопротекторов.

Материалы и методы исследования

Мята длиннолистная (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) — многолетнее травянистое растение, вид рода семейства Яснотковые (*Lamiaceae*). Эфирное масло мяты применяют при невралгиях, ревматизме, а также в качестве ароматического средства [3, 4].

Замораживание семян проводили в пластиковых пробирках. Предварительно готовили растворы криопротекторов заданных концентраций. Вносили криопротекторы двумя способами: при комнатной температуре и на ледяной бане. После инкубации с криопротекторами в течение 10–15 мин осуществляли быстрое замораживание прямым погружением в жидкий азот. Оттаивание проводили медленное, при комнатной температуре. После отогревания криопротекторы трехкратно отмывали дистиллированной водой.

Отмытые семена высаживали в чашки Петри на два слоя фильтровальной бумаги для определения сохранения их жизнеспособности.

Жизнеспособность семян определяли по двум показателям — всхожесть и энергия прорастания [5]. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Исходная всхожесть семян мяты длиннолистной составила 76,3±2 %, а энергия прорастания — 70,3±1,8 %. При замораживании в жидком азоте без применения криопротекторов жизнеспособность семенного материала значительно уменьшилась. Всхожесть составила 64,9±0,8 %, а энергия прорастания стала меньше почти в 4 раза — 18,95±0,2 %. Следует отметить, что именно показатель энергии прорастания оказался чувствительным к депонированию семенного материала при экстремально низких температурах.

Анализ результатов (см. табл.) сохранения жизнеспособности семян мяты длиннолистной при замораживании их в криопротекторах различного состава в случае внесения их при комнатной температуре показал, что тенденция резкого снижения энергии прорастания наблюдается во всех вариантах эксперимента. Наибольшее падение этого показателя видим при замораживании семян в поливинилпирролидоне (ПВП) — 8,7±0,1 % и 8,4±0,2 %. Лучше всего данная ростовая характеристика сохраняется при использовании в качестве криопротектора глицерина — 26–32 %. В целом, использование криопротекторов в том случае, когда семенной материал погружали в них при комнатной температуре, не способствовало улучшению сохранности биообъекта; а замораживание в диметилсульфоксиде (ДМСО) и ПВП привело к меньшей степени выживания по сравнению с криодепонированием семян мяты длиннолистной без криопротекторов.

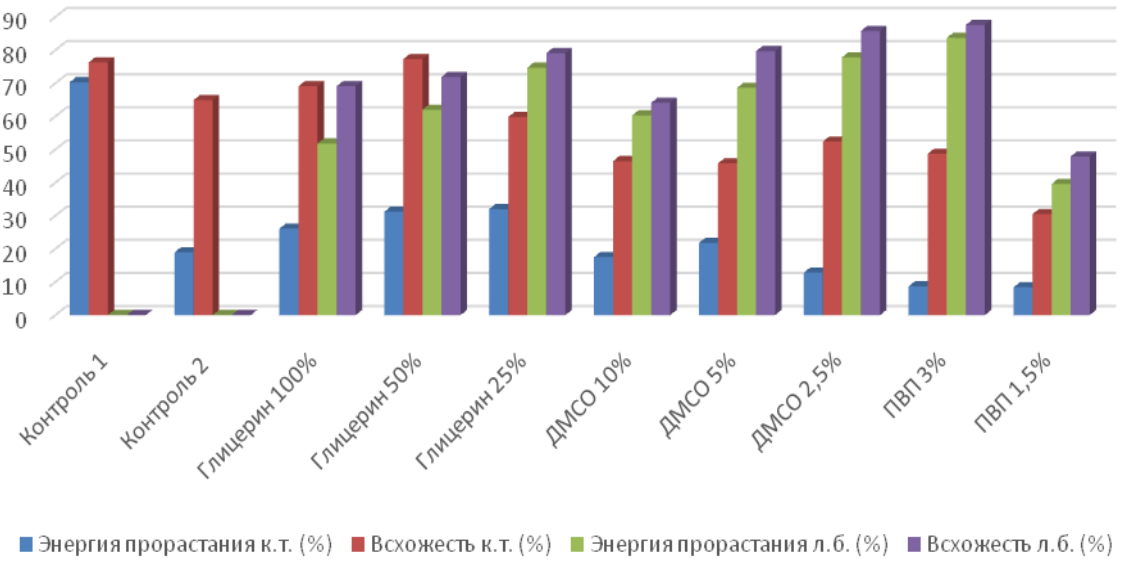
Таблица

Влияние различных криопротекторов и способов их внесения на ростовые характеристики семенного материала мяты длиннолистной после криоконсервации

Криопротекторы	Внесение криопротектора при комнатной температуре		Внесение криопротектора на ледяной бане	
	энергия прорастания, %	всхожесть, %	энергия прорастания, %	всхожесть, %
Контроль 1 (исходная всхожесть)	70,3±1,8	76,3±2	–	–
Контроль 2 (замораживание без криопротекторов)	18,95±0,2	64,9±0,8	–	–
Глицерин 100 %	26,1±1,2	69,1±2,2	51,8±0,6	69,1±0,6
Глицерин 50 %	31,2±0,9	77,3±2,1	62±0,6	71,9±0,7
Глицерин 25 %	32±0,8	59,8±1,5	74,7±0,65	79,1±1,1
ДМСО 10 %	17,5±0,2	46,5±0,5	60,3±1,1	64,1±1,2
ДМСО 5 %	21,8±0,2	45,8±0,4	68,6±1,2	79,7±2,2
ДМСО 2,5 %	12,8±0,1	52,4±0,5	77,82±2,1	85,8±3,1
ПВП 3 %	8,7±0,1	48,7±0,5	83,7±2	87,6±2,3
ПВП 1,5 %	8,4±0,2	30,5±0,3	39,6±0,5	47,9±0,7

Только замораживание семян в 50 и 100 %-ном глицерине позволило сохранить жизнеспособность семенного материала практически на исходном уровне. Всхожесть семян в этом варианте эксперимента составила 69,1±2,2 % и 77,3±2,1 % соответственно, что составляет 90,5 % и 101,3 % от исходных показателей.

Чрезвычайно интересные результаты были получены в случае внесения криопротекторов при температуре 0 °С, т.е. на ледяной бане. В этом варианте эксперимента при замораживании в любом типе криопротектора значительно возросла сохранность чувствительного у этого вида показателя — энергии прорастания. При применении глицерина 25 %, ДМСО 2,5 % и ПВП 3 % энергия прорастания превысила исходные значения, т.е. мы наблюдаем стратификационный эффект криодепонирования. А если сравнивать этот показатель с данными, полученными в экспериментах «теплого» внесения криозащитных средств, то эта характеристика выше в 9,7 раза у ПВП 3 % и в 6 раз у ДМСО 2,5 % (см. рис.).



к.т. — внесение криопротектора при комнатной температуре; л.б. — внесение криопротектора на ледяной бане

Рисунок. Зависимость сохранения жизнеспособности семян мяты длиннолистной от криопротекторов, их концентрации и способа внесения

Наилучшими вариантами криопротекторов для сохранения ростовых характеристик семенного материала оказались ДМСО 2,5 % и ПВП 3 %. Всхожесть семян, сохраняемых в этих криопротекторах, составила 85,8±3,1 % и 87,6±2,3 % соответственно, что выше исходной характеристики на 9,5 % и 11,3 %.

Интересно отметить, что увеличение концентрации эндоцеллюлярного криопротектора ДМСО до 5 и 10 % приводило к снижению выживаемости семенного материала мяты длиннолистной при криоконсервации, что, вероятно, связано с его токсическим эффектом. Хотя показатели эти и меньше наиболее оптимальных, но все равно способствуют лучшему сохранению биологического объекта, чем без применения криопротекторов. Относительно экзоцеллюлярного криопротектора, ПВП отмечаем, что снижение его концентрации до 1,5 % в криозащитном растворе приводило к серьезному снижению выживаемости семян. Ростовые характеристики в этом варианте опыта были меньше, чем в случае замораживания семян в жидком азоте без криопротекторов.

Некоторые исследователи отмечают, что глицерин при температуре, близкой к температуре кристаллизации воды, может вести себя как экзоцеллюлярный криопротектор; этот эффект наблюдают на некоторых типах клеток. Возможно, результаты, полученные в нашем эксперименте, связаны с этим эффектом, так как серьезного улучшения сохранности жизнеспособности семян по показателю всхожести не наблюдали, в отличие от вариантов с другими криопротекторами. Хотя к повышению чувствительной характеристики — энергии прорастания изменение способа внесения глицерина привело. Энергия прорастания семян выше почти в 2 раза, по сравнению с внесением глицерина при комнатной температуре.

Можно предположить, что механизм наблюдаемого эффекта лучшего сохранения показателей жизнеспособности семян при низкотемпературном внесении криопротекторов перед криоконсервацией связан с несколькими факторами. Во-первых, это адаптация или, как еще называют, снижение сенсибилизации клеток зародыша семени при предварительном охлаждении до точки кристаллизации воды. Такое двухступенчатое охлаждение приводит к дегитратации клеток, а, значит, к меньшим повреждениям от внутриклеточной кристаллизации. Во-вторых, при более низких температурах происходит торможение обмена веществ, а в связи с этим и меньшее токсическое воздействие криопротектора на клетки зародыша семени. Важно отметить, что на примере криоконсервации семенного материала мяты длиннолистной мы наблюдаем значимость самых разных факторов и условий замораживания и отогрева на количество выживаемого при криодепонировании биологического материала, в частности — температуры внесения криопротектора.

Заключение

Оптимизация условий замораживания биологических объектов в жидком азоте, а именно скорость снижения температуры, состав и количество криопротекторов, температурные условия их внесения, условия отогрева, иногда даже тара, используемая для криоконсервации, способствуют тому, что живые объекты могут сохраняться длительное время без потери жизнеспособности.

Нами рассмотрено влияние криопротекторов, их концентраций и способов внесения на сохранение ростовых характеристик семенного материала мяты длиннолистной при депонировании в жидком азоте. Выявлено, что оптимальным способом внесения криопротекторов является температура, близкая к 0 ^{o}C, в этом случае серьезно повышается как всхожесть, так и энергия прорастания семян.

Наилучшим вариантом криопротектора для криоконсервации семян мяты длиннолистной является поливинилпирролидон в концентрации 3 %, ростовые характеристики семенного материала в этом случае превышали исходные показатели на 10 %.

Список литературы

1 Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation / B. Kaviani // Australian Journal of Crop Science. — 2011. — Vol. 5, No. 6. — P. 778–800.

2 Белоус А.М. Криобиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко. — Киев: Наук. думка, 1994. — 432 с.

3 Дудченко Л.Г. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения: справоч. / Л.Г. Дудченко, А.С. Козьяков, В.В. Кривенко. — Киев: Наук. думка, 1989. — 304 с.

4 Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. — Т. 3. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов. — М.: Изд-во КМК, 2004. — 520 с.

5 Зорина М.С. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов / М.С. Зорина, С.П. Кабанов // Методики интродукционных исследований в Казахстане. — Алма-Ата: Наука, 1986. — С. 75–85.

А.Ш. Додонова, Д.Д. Антипова

Криопротекторларды енгізу әдісінің криоконсервация кезінде ұзынжапырақты жалбыздың тұқымдық материалын сақтауға әсерін зерттеу

Мақала ұзынжапырақты жалбыздың тұқымдық материалын криоконсервациялау шарттарын оңтайландыруға арналған. Ұзынжапырақты жалбыз парфюмерия, фармацевтика және тамақ өнеркәсібінде белсенді қолданылатын эфирмайлы өсімдік. Криоконсервациялау эксперименттерінде мына ішкі жасушалық және экзоклеткалық криопротекраттар қолданылды: поливинилпирролидон (PVP), глицерин және диметисульфоксид (DMSO). Сонымен қатар, криопротекторды енгізу әдісімен бөлме температурасында және мұз ваннасында криоконсервациялау кезінде тұқымның өсу сипаттамаларының сақталуына әсері зерттелген. Ұзынжапырақты жалбыз тұқымдарының бастапқы өнуі 76,3±2 %, өну энергиясы 70,3±1,8 % болды. Сұйық азотта криопротекторларды қолданбай мұздатқанда өну жылдамдығы 64,9±0,8 %, өну энергиясы 18,95±0,2 % құрады. Бұл өте төмен температурада тұқымдық материалдың шөгуіне сезімтал болып шыққан өну энергиясының көрсеткіші екенін атап өткен жөн. Ұзынжапырақты жалбыз тұқымдарын бөлме температурасында енгізген жағдайда әртүрлі құрамдағы криопротекторларда мұздатқан кезде олардың өміршеңдігін сақтау нәтижелерін талдау өнгіштік энергиясының күрт төмендеуі тенденциясы эксперименттің барлық нұсқаларында байқалатынын көрсетті. Тұқымдық материалдың өсу сипаттамаларын сақтау үшін криопротекторлардың ең жақсы нұсқалары мұз ваннасында қолданылатын DMSO 2,5 % және PVP 3 % болды. Осы криопротекторларда сақталған тұқымдардың өнгіштігі сәйкесінше 85,8±3,1 % және 87,6±2,3 % құрады. Осылайша, ұзынжапырақты жалбыз тұқымын криоконсервациялау кезінде криопротекторларды қолданудың ең жақсы тәсілі 0°С-қа жақын температура екені анықталды, бұл жағдайда өнгіштік те, тұқымның өну энергиясы да айтарлықтай артады.

Кілт сөздер: криосақтау, криоконсервациялау, криопротектор, тұқымдық материал, ұзынжапырақты жалбыз, өну, өну энергиясы, мұз моншасы.

A.Sh. Dodonova, D.D. Antipova

Study of the effect of the method of applying cryoprotectors on the preservation of *Mentha longifolia* seed material during cryopreservation

This article is devoted to optimizing the conditions for cryopreservation of seed material of *Mentha longifolia*. *Mentha longifolia* is an essential oil plant that is actively used in the perfumery, pharmaceutical and food industries. The cryopreservation experiments use the following endocellular and exocellular cryoprotectants: polyvinylpyrrolidone (PVP), glycerol, and dimethysulfoxide (DMSO). In addition, we study the effect of the growth characteristics of seeds on the preservation during cryopreservation of the method of applying a cryoprotectant: at room temperature and in an ice bath. The initial germination of long-leaved mint seeds is 76.3±2 %, and the germination energy is 70.3±1.8 %. When frozen in liquid nitrogen without the use of cryoprotectants, the germination rate was 64.9±0.8 %, and the germination energy was 18.95±0.2 %. It should be noted that the germination energy indicator turned out to be sensitive to the deposition of seed material at extremely low temperatures. An analysis of the results of maintaining the viability of long-leaved mint seeds when they are frozen in cryoprotectants of various compositions in the case of their introduction at room temperature indicates that the tendency for a sharp decrease in germination energy is observed in all variants of the experiment. The best options for cryoprotectants to preserve the growth characteristics of the seed material are DMSO 2.5 % and PVP 3 % applied in an ice bath. The germination of seeds stored in these cryoprotectants is 85.8±3.1 % and 87.6±2.3 %, respectively. Thus, it is found that the best way to apply cryoprotectants during cryopreservation of long-leaved mint seeds is a temperature close to 0 °C; in this case, both germination and seed germination energy are seriously increased.

Keywords: cryopreservation, cryoconservation, cryoprotectant, seed material, long-leaved mint, germination, germination energy, ice bath.

References

1 Kaviani, B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science, 5 (6)*; 778–800.

2 Belous, A.M., & Grishchenko, V.I. (1994). *Kriobiologiia [Cryobiology]*. Kiev: Naukova dumka [in Russian].

3 Dudchenko, L.G., Koziakov, A.S., & Krivenko, V.V. (1980). Priano-aromaticheskie i priano-vkusovye rasteniia: spravochnik [Spicy-aromatic and spicy-flavoring plants: reference book]. Kiev: Naukova dumka [in Russian].

4 Gubanov, I.A. (2004). *Illiustrirovannyi opredelitel rastenii Srednei Rossii. T. 3. Pokrytosemennye (dvudolnye: razdelnolepestnye) [Illustrated determinant of plants of Middle Asia. Vol. 3. Magnoliophyta (Dicotyledones, Polypetalae)]*. Moscow: Publishing house KMK [in Russian].

5 Zorina, M.S., & Kabanov, S.P. (1986). Opredelenie semennoi produktivnosti i kachestva semian introdutsentov [Assessment of quality of seeds of introduced plants]. *Metodiki introduktsionnykh issledovanii v Kazakhstane — Methodology of introduction study in Kazakhstan*. Alma-Ata: Nauka, 75–85 [in Russian].