

УДК 582.942.4–116.5.085:577.352.466:547.42:606

Н.О. Шевченко^{1*}, Г.В. Коваленко¹, І.Ф. Коваленко², Т.Ф. Стрибуль¹

Визначення осмотичних реакцій меристем батату у криозахисних розчинах

UDC 582.942.4–116.5.085:577.352.466:547.42:606

N.O. Shevchenko^{1*}, G.V. Kovalenko¹, I.F. Kovalenko², T.F. Stribul¹

Discovery of Osmotic Responses of Sweet Potato Meristems in Cryoprotective Solutions

Ключові слова: батат, меристеми, розчини, що вітрифікуються, осмотичні реакції.

Key words: sweet potato, meristems, plant vitrification solutions, osmotic reaction.

Батат (*Ipomoea batatas* L.) вирощується у багатьох регіонах світу та за виробництвом посідає сьоме місце серед найважливіших харчових культур. Вірусні захворювання (зокрема *Sweet potato feathery mottle virus* та *Sweet potato chlorotic stunt virus*) перешкоджають одержанню великих урожаїв цієї рослини [1, 4, 5].

Відомо, що батат розмножується вегетативно, тому постійне постачання безвірусного посадкового матеріалу має вирішальне значення для його сталого виробництва. Культуру меристем широко використовують для отримання безвірусних клонів культурних рослин. Ефективність видалення вірусів залежить від розміру верхівкових меристем: чим менший розмір зразка, тим більша ймовірність отримання безвірусної рослини. Останнім часом кріоконсервування вважається ефективним методом елімінації вірусів з рослинного матеріалу [5].

За даними літератури життєздатність меристем батату після низькотемпературного впливу не перевищує 40% [3]. Це може бути пов'язане з тим, що термін експозиції зразків у криозахисних розчинах є або недостатнім для ефективної дегідратації, або, навпаки, занадто тривалим, що призводить до прояву токсичної дії хімічних сполук. Отже, підбір криозахисного середовища та термінів експозиції меристем – надзвичайно актуальна проблема.

Метою даної роботи було дослідження осмотичних реакцій меристем батату у криозахисних розчинах для визначення терміну експозиції з максималь-

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) is grown in many regions worldwide and is the seventh most important food crop. Viral diseases, such as *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato chlorotic stunt virus*, prevent high yields of this plant [1, 4, 5].

It is known that sweet potatoes propagation is vegetative, so the constant supply of virus-free planting material is crucial for its sustainable production. Meristematic culture is widely used to obtain virus-free clones of cultivated plants. The effectiveness of virus clearance depends on the size of the apical meristems: the smaller the sample size, the higher probability of obtaining a virus-free plant. Recently, cryopreservation is considered an effective method of eliminating viruses from plants [5].

According to the published data, the viability of sweet potato meristems after low temperature exposure does not exceed 40% [3]. This may be due to the fact that the exposure time of the samples in cryoprotective solutions is either insufficient for effective dehydration, or, conversely, too long, resulting in the manifestation of toxic effect of chemical compounds. Therefore, the selection of cryoprotective medium and exposure time of meristems is an extremely important issue.

The research aim was to study the osmotic responses of sweet potato meristems in cryoprotective solutions to determine the exposure time with maximum dehydration of samples and prevent the manifestation of their toxic effect.

¹ Лабораторія фітокріобіології відділу холодової адаптації;

² Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

¹ Laboratory of Phytocryobiology of Cold Adaptation Department;

² Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: nadiyashevchenko@gmail.com

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 4143, fax: +380 57 373 5952
e-mail: nadiyashevchenko@gmail.com

Надійшла 02.02.2020

Прийнята до друку 20.04.2021

Received 02, February, 2020

Accepted 20, April, 2021

© 2021 N.O. Shevchenko, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ною дегідратацією зразків та запобігання прояву їхньої токсичної дії.

Матеріалом для досліджень були меристеми батату сорту Вінницький рожевий, одержані з пагонів, які вирощували в лабораторних умовах. У контейнери з попередньо прожареним піском горизонтально закладали клубні батату, загортаючи їх наполовину. Із пророщених пагонів виділяли пазушні меристеми, які поміщали на живильне середовище Murasige and Skoog (MS) [2] без додавання гормонів та сахарози.

Розчини для визначення осмотичної реакції меристем готували на сольовому середовищі MS. У роботі використовували суміші кріопротекторів, розроблені для низькотемпературного зберігання меристем різних видів рослин методами, які базуються на вітрифікації (plant vitrification solutions (PVS)): PVS2 (30% гліцерину + 15% етиленгліколю + 15% диметилсульфоксиду + 13% сахарози); 88% PVS3 (44% гліцерину + 44% сахарози); PVSN (34% сахарози + 18% гліцерину + 15% етиленгліколю).

Осмотичну реакцію меристем на дію кріопротекторів вивчали за допомогою флуоресцентного мікроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина).

Під мікроскоп на предметне скло з лункою наносили меристему батату в краплі середовища MS і фотографували. Площу отриманого зображення визначали за допомогою програмного забезпечення «AxioVision Rel.4.8» («Carl Zeiss», Німеччина). Середовище MS видаляли, замість нього додавали 200 мкл кріозахисного розчину і фіксували зміну площі зображення в часі. Досліди проводили для кожної меристеми індивідуально до припинення зміни об'єму, після чого додавали рідке живильне середовище і спостерігали за регідратацією. Дослід повторювали не менше трьох разів для кожного розчину.

Результати, отримані за допомогою осмотичних реакцій, порівнювали з показниками життєздатності меристем залежно від терміну експозиції у кріозахисних розчинах. Виділені з тритижневих рослин зразки, які росли в умовах *in vitro*, витримували у відповідних розчинах протягом 10–90 хв, після чого трикратно відмивали від кріопротекторів рідким живильним середовищем MS із 10% сахарози. Культивування меристем проводили на твердому живильному середовищі MS із додаванням 3% сахарози, 5% агар-агару та фітогормонів. Регенеративну здатність визначали за кількістю меристем, які утворювали пагони з листками і корені. У кожному досліді використовували по 10 меристем у трикратній повторності. Термін спостереження складав 30 днів.

The research material was the sweet potato meristems of Vinnitsky rozhevyy variety, obtained from the shoots grown under laboratory conditions. Sweet potatoes were put horizontally into containers with pre-calcined sand, wrapping them in half. Axillary meristems were isolated from the germinated shoots. Then they were placed in a nutrient medium Murasige and Skoog (MS) [2] with no addition of hormones and sucrose.

Solutions for determining the osmotic responses of meristems were prepared in saline medium MS. We used mixtures of cryoprotectants developed for low-temperature storage of meristems of different plant species by the methods based on vitrification (plant vitrification solutions (PVS)): PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sulfoxide + 13% sucrose), 88% PVS3 (44% glycerol + 44% sucrose), PVSN (34% sucrose + 18% glycerol + 15% ethylene glycol).

The osmotic response of meristems on cryoprotectant effect was studied using a Axio Observer Z1 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany).

Sweet potato meristem was placed on a glass slide under a microscope in a drops of MS medium and photographed. The area of the obtained image was determined using AxioVision Rel.4.8 software (Carl Zeiss, Germany). The MS medium was removed, 200 μ l of cryoprotectant solution was added instead of it, and the change in image area in time was recorded. The experiments were performed in each meristem individually until the volume change stopped, thereafter liquid nutrient medium was added and rehydration was monitored. The experiment was repeated at least three times for each solution.

The results obtained by osmotic responses were compared with the viability of meristems depending on the exposure time in cryoprotective solutions. The samples isolated from three-week-old plants grown *in vitro* were kept in appropriate solutions for 10–90 min, after which they were washed three times from cryoprotectants using liquid nutrient medium MS with 10% sucrose. The meristems were cultured in MS solid medium with the addition of 3% sucrose, 5% agar-agar and phytohormones. Regenerative capacity was determined by the number of meristems that formed shoots with leaves and roots. In each experiment, 10 meristems were used thrice. The observation period was 30 days.

The study results were statistically processed using PAST v 3.11 software (Oyvind Hammer, Norway).

The results of the study of osmotic responses of sweet potato meristems to the effect of cryoprotective solutions are presented in Fig. 1. The smallest change in the relative area of meristems (down to



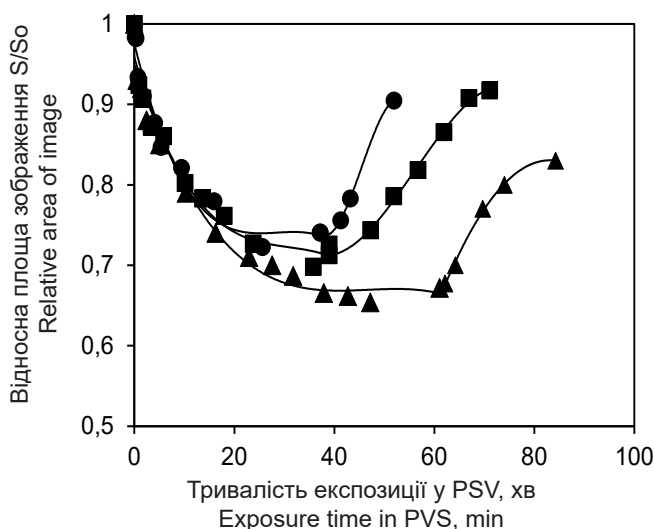


Рис. 1. Осмотичні реакції меристем батату у PVS: ● – PVS 3, ■ – PVS 2, ▲ – PVS N.

Fig. 1. Osmotic responses of sweet potato meristems in PVS: ● – PVS 3, ■ – PVS 2, ▲ – PVS N.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програмного забезпечення «PAST v 3.11» («Oyvind Hammer», Norway).

Результати з дослідження осмотичних реакцій меристем батату на дію криозахисних розчинів представлені на рис. 1. Найменшу зміну відносної площі меристем (до 28%) спостерігали за дії PVS2 та 88% PVS3, значуще більшою була їхня дегідратація у PVS N (до 35%). Також показано, що максимальна дегідратація у зазначених розчинах відбувається у різні терміни. За використання PVS2 та 88% PVS3 зміна об'єму зразків припинялася уже через 45 хв, що свідчить про успішну дегідратацію меристем. Подовження терміну експозиції може призвести до прояву токсичної дії криопротекторів. У разі використання PVS N для успішного криоконсервування дегідратація меристем батату повинна бути не менше ніж 60 хв.

На рис. 2 представлено результати дослідження впливу терміну експозиції у криозахисних розчинах на регенеративну здатність меристем батату. Показано, що у PVS2 після 30-хвилинної інкубації зразків спостерігається тенденція до зниження їх регенеративної здатності, після 40-хвилинної експозиції цей показник значуще знижується по відношенню до контролю, але рівень життєздатних меристем достатній для успішного криоконсервування. Після 30-хвилинної експозиції у 88% PVS3 здатність до відновлення росту меристем значуще зменшується. Подовження терміну витримки зразків у даному розчині призводить до значної втрати показників їхньої життєздатності. Більш того, через 1,5 години усі меристеми виявляються повністю нежиттєздатними. На відміну від

28%) was observed with PVS2 and 88% PVS3, their dehydration was significantly higher using PVS N (up to 35%). It has been also shown that the maximum dehydration in these solutions occurs at different terms. Using PVS2 and 88% PVS3 the change in sample volume stopped after 45 min, indicating successful dehydration of the meristems. Prolonged exposure may result in toxic effects of cryoprotectants. When using PVS N the dehydration of sweet potato meristems should be at least 60 min for successful cryopreservation.

Fig. 2 presents the study results of exposure time effect in cryoprotective solutions on regenerative capacity of sweet potato meristems. It was shown that in PVS2 after 30-min incubation of samples there was a tendency to reduce their regenerative capacity, after 40 min of exposure this index decreased significantly relative to the control, but the level of viable meristems would be sufficient for successful cryopreservation. In 88% of PVS3, the capacity to growth recovery of meristems is significantly reduced after 30 min of exposure. Prolongation of exposure time of the samples in this solution resulted in a significant loss of their viability. Moreover, after 90 min, all meristems were completely unviable. PVS N at the incubation stage did not show a pronounced toxic effect contrary to the previously mentioned solutions, a significant decrease in the regenerative capacity was observed after 50 min of exposure. A sufficient level of viable meristems (at the level of 70%) was even after a 70-min exposure of the samples in this solution.

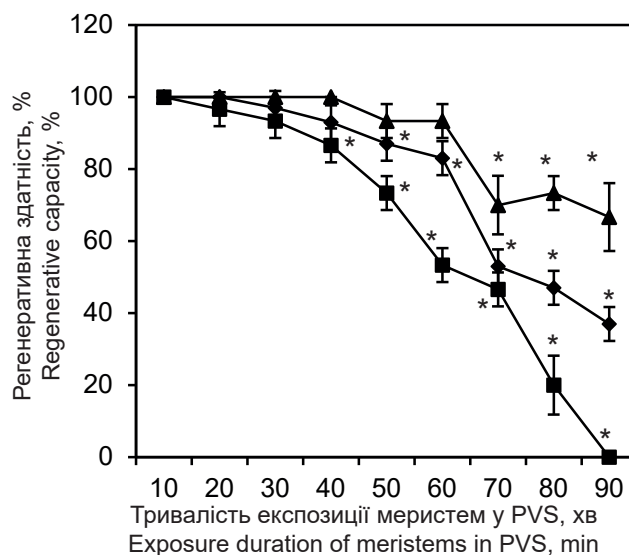


Рис. 2. Регенеративна здатність меристем батату залежно від тривалості експозиції у PVS: ■ – 88% PVS 3, ▲ – PVS N, ◆ – PVS 2; * – відмінності значущі відносно необроблених меристем.

Fig. 2. Regenerative capacity of sweet potato meristems depending on exposure time in PVS: ■ – 88% PVS 3, ▲ – PVS N, ◆ – PVS 2; * – differences are significant relative to the untreated meristems.



уже зазначених розчинів, PVSN на етапі інкубації не проявляє вираженої токсичної дії, значуще зниження показника регенеративної здатності спостерігається після 50-хвилинної експозиції. Достатній рівень життєздатних меристем (70%) спостерігався навіть після 70-хвилинної витримки зразків у даному розчині.

Порівняння результатів дослідження осмотичної поведінки меристем батату у криозахисних розчинах з показником їхньої регенеративної здатності показало, що термін припинення зміни площі зразків співпадає з початком зниження рівня життєздатності. Цей факт, на нашу думку, можна пояснити проявом власної токсичності криозахисних розчинів.

Таким чином, зменшення площі меристем батату за рахунок осмотичних реакцій у досліджених криозахисних розчинах припиняється після 40 хв експозиції у PVS2 та 88% PVS3 та після 60 хв – у PVSN. Максимальне зменшення об'єму зразків (до 35%) відбувається у випадку використання PVS N. Показник регенеративної здатності меристем після експозиції у розчинах, які вітрифікуються, значуще знижується порівняно з контрольним значенням на 30-у хвилину у випадку 88% PVS3, 40-ту хвилину – PVS2 та 50-ту хвилину – PVSN. Зменшення кількості життєздатних зразків, якої недостатньо для криоконсервування (менше 70%), спостерігається через 60 хв експозиції меристем у 88% PVS3, 70 хв – у PVS2 та 90 хв – у PVSN.

Для розробки ефективних протоколів криоконсервування меристем батату перспективними криозахисними розчинами є PVS2, PVSN та час експозиції зразків 40 і 60 хв відповідно.

Для розробки процедур криоконсервування меристем різних видів рослин необхідне дослідження їхньої осмотичної реакції у криозахисних розчинах, що дозволить визначити оптимальний термін дегідратації експериментальних зразків перед охолодженням до температур рідкого азоту.

Література

1. Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT. Interactions between a crinivirus, an impomovirus and a potyvirus in coinfection sweetpotato plants. *Plant Pathology*. 2006; (53): 458–67.
2. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 1962; (15): 473–97.
3. Park SU, Kim HH. Cryopreservation of sweet potato shoot tips using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*. 2015; 36(5): 344–52.

Comparison of the study results of the osmotic behavior of sweet potato meristems in cryoprotective solutions with the index of their regenerative capacity showed that the termination of changes in the sample area coincided with the onset of the decrease in viability level. This fact, in our opinion, can be explained by the manifestation of the toxicity of cryoprotective solutions.

According to the obtained results we can conclude that the decrease in the area of sweet potato meristems due to osmotic responses in the studied cryoprotective solutions stops after 40 min of exposure in PVS2 and 88% PVS3 and after 60 min in PVSN. The maximum reduction in sample volume (down to 35%) occurs when using PVSN. The index of regenerative capacity of meristems after exposure in vitrified solutions is significantly reduced compared to the control value to minute 30 using 88% PVS3, when using PVS2 this occurs to minute 40 and for PVSN to minute 50. A decrease in the number of viable samples, that is insufficient for cryopreservation (less than 70%), is observed after 60 min of meristem exposure in 88% PVS3, 70 min in PVS2 and 90 min in PVSN.

PVS2, PVSN cryoprotective solutions and sample exposure time of 40 and 60 min, respectively, are promising to develop the effective protocols for cryopreservation of sweet potato meristems.

To establish procedures for cryopreservation of meristems of different plant species, it is necessary to study their osmotic response to cryoprotective solutions, that will allow to determine the optimal time of dehydration of experimental samples prior to cooling down to liquid nitrogen temperatures.

References

1. Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT. Interactions between a crinivirus, an impomovirus and a potyvirus in coinfection sweetpotato plants. *Plant Pathology*. 2006; (53): 458–67.
2. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 1962; (15): 473–97.
3. Park SU, Kim HH. Cryopreservation of sweet potato shoot tips using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*. 2015; 36(5): 344–52.
4. Tugume AK, Mukasa SB, Valkonen JP. Mixed infections of four viruses, the incidence and phylogenetic relationships of sweet potato chlorotic fleck virus (*Betaflexiviridae*) isolates in wild species and sweetpotatoes in Uganda and evidence of distinct isolates in East Africa. *PLoS One* [Internet]. 2016; 11(12):e0167769. [cited 2020 Feb 17]; Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167769>



4. Tugume AK, Mukasa SB, Valkonen JP. Mixed infections of four viruses, the incidence and phylogenetic relationships of sweet potato chlorotic fleck virus (*Betaflexiviridae*) isolates in wild species and sweetpotatoes in Uganda and evidence of distinct isolates in East Africa. PLoS One [Internet]. 2016; 11(12):e0167769. [cited 2020 Feb 17]; Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167769>
5. Wang QC, Cuellar WJ, Rajamäki M-L, et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Mol Plant Pathol. 2008; 9(2): 237–50.

