

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение средняя
общеобразовательная школа № 3 города Лебедянь
Лебедянского муниципального округа Липецкой области

Липецкая область, г. Лебедянь

Номинация «Ботаника и экология растений»

Действие криопротекторов на жизнедеятельность клеток растительных тканей при замораживании

Автор: Нелюбова Анна Алексеевна, 10 класс

МБОУ СОШ № 3 г. Лебедянь Липецкой области

Руководитель: Князькова Светлана Александровна,

учитель биологии МБОУ СОШ № 3 г. Лебедянь Липецкой области

2025 год

Оглавление

	Стр.
Введение.....	3
Глава 1. Обзор источников информации.....	4
1.1. Введение в проблемы воздействия на растения низких температур.....	4
1.2. Типы криопротекторов.....	5
Глава 2. Результаты исследования и их обсуждение.....	6
2.1. Проведение эксперимента.....	6
2.2. Результаты эксперимента.....	9
Выводы.....	11
Заключение.....	11
Список использованных источников информации.....	13

Введение

Последнее время с нашей погодой творится что-то непонятное. Мы наблюдаем аномальную тёплую зиму с отсутствием привычных снегопадов и морозов. Весна 2024 года наоборот, была достаточно холодной и принесла с собой череду возвратных заморозков, которые нанесли внушительный урон урожаю яблок, клубники, вишни и другим сельскохозяйственным культурам. Да и в этом году синоптики предсказывают, что теплой и ранней весны ждать не следует. Низкие температуры ещё вернутся и могут оставить садоводов без урожая.

Меня заинтересовало, как растения могут противостоять серьёзному экологическому стрессу, который вызывается низкой температурой. И ещё при обсуждении данной темы я услышала незнакомое для себя слово – криопротекторы.

Я выяснила, что так называются вещества, способные защищать клетки от повреждений, возникающих в результате замораживания. В условиях глобальных изменений климата и увеличения частоты экстремальных температур исследование морозоустойчивости растительных тканей становится особенно актуальным, так как это может способствовать улучшению сельскохозяйственного производства и сохранению биоразнообразия. Так возникла тема моей исследовательской работы.

В процессе исследования я хочу подтвердить гипотезу о том, что существуют вещества, которые способны защитить клетки от повреждений при воздействии низких температур.

Цель работы: изучить механизм действия криопротекторов на жизнедеятельность клеток при их замораживании.

Для достижения данной цели я поставила перед собой следующие **задачи:**

1. Познакомиться с классификацией криопротекторов.
2. Изучить механизм действия криопротекторов.
3. Провести эксперимент по изучению действия криопротекторов на жизнедеятельность клеток растительных тканей при замораживании.
4. Выявить наиболее эффективные вещества, используемые в качестве криопротекторов и их концентрацию.

Объект исследования: клетки растений.

Предмет исследования: защитное действие криопротекторов на растительные клетки при замораживании.

Методы исследования: изучение литературы, работа с ресурсами интернет, наблюдение, измерение, эксперимент, обработка полученной информации.

Практическая значимость работы: разработка рекомендаций для приусадебного участка, направленных на повышение морозоустойчивости растений, что может существенно повлиять на урожайность сельскохозяйственных культур и их приспособление к неблагоприятным климатическим условиям.

Глава 1. Обзор источников информации по теме исследования

1.1. Введение в проблемы воздействия на растения низких температур

Наша страна находится в зоне рискованного земледелия, поэтому поиск криопротекторов является весьма актуальной проблемой - для большей части территории страны характерны длительные периоды с температурами ниже нуля градусов.

Повреждение тканей растений при замораживании является серьезной проблемой, вызывающей гибель тепличных и садовых культур. Основным фактором, способствующим этому процессу, является образование льда как внутри клеток, так и вне их. Внутренний лед образуется при снижении температуры ниже нуля в виде кристаллов, которые разрушают мембраны клеток, что является одной из основных причин гибели растений. Такие подъемы давления, вызванные кристаллообразованием, могут значительно повредить клеточные стенки и органеллы [1].

Важным аспектом, о котором следует упомянуть, являются условия, способствующие вымерзанию растений. Например, отсутствие снегового покрова значительно увеличивает вероятность вымерзания, так как снег служит естественным изолятором, защищая растения от перепадов температур [2]. Поэтому агрономы и садоводы должны учитывать эти факторы при выборе видов и сортов для посадки в условиях региона с холодным климатом.

Также важно отметить, что для улучшения устойчивости растений к морозам необходимо проводить работы по улучшению структуры почвы и сдерживанию влаги. Хорошая увлажненность, обеспечиваемая правильным поливом и агрономическими практиками, может снизить риск вымерзания. Правильный выбор места размещения для посадки также может помочь защитить растения от фатальных последствий низких температур [1].

Еще Н.А. Максимов в прошлом веке объяснил, что истинной причиной повреждения и гибели растений при отрицательных температурах является давление кристаллов льда на обезвоженные клетки. Чем больше образуется льда в межклетниках, тем больше гибнет клеток. Также важен характер заморозков: при медленном замораживании лед образуется вне клеток, и они по большей части остаются живыми после оттаивания, а вот при очень быстром замораживании вода не успевает выйти из протопласта, и лед образуется внутри плазмы клетки, при этом клетки, в основном, погибают [5].

На морозоустойчивость существенное влияние оказывают условия почвенного питания, особенно в осенний период. Устойчивость растений к морозу возрастает на постоянно известкуемых почвах при внесении под посев озимых калийно-фосфорных удобрений, тогда как избыточные азотные удобрения, способствуя процессам роста, делают озимые растения более чувствительными к морозам. На морозоустойчивость, как и на холодостойкость растений, положительное влияние оказывают микроэлементы (кобальт, цинк, молибден, медь, ванадий и др.). Например, цинк повышает содержание связанной воды, усиливает накопление сахаров, молибден способствует увеличению содержания общего и белкового азота [6].

Комплексный подход к изучению морозостойкости растений — это не только вопрос сельского хозяйства, но и значимый аспект биологической безопасности и устойчивости экосистем к изменениям климата. Создание методов, позволяющих исследовать не только физиологические, но и генетические аспекты морозоустойчивости, может стать залогом успеха в селекции новых, устойчивых к холодам сортов.

1.2. Типы криопротекторов

Криопротекторы – это вещества, которые минимизируют повреждения клеток при замораживании. К ним относятся такие соединения, как глицерин, сорбит, пропиленгликоль и сахароза. Следует отметить, что эффективность криопротекторов зависит от их способности образовывать стекловидную фазу и уменьшать дегидратацию клеток. Криопротекторы защищают клетки от образования кристаллов льда, которые могут вызывать механическое повреждение и нарушать целостность клеточных мембран [3].

Устойчивость растений к заморозкам обеспечивают сахара в составе клеточного сока. Их резкое снижение во время активного роста объясняется преобразованием сахаров в вещества, необходимые для развития побегов, листвы и для цветения. По воздействию на растения криопротекторы делятся на два типа: проникающие и непроникающие [4].

Проникающие криопротекторы поступают внутрь клеток растений и препятствуют образованию кристаллов льда. Чаще всего упоминаются глицерин и диметилсульфоксид.

Непроникающие криопротекторы остаются на поверхности листьев и коре растений. Принцип защитного действия точно не выяснен. Возможно, таким образом подавляется рост кристаллов и предотвращается резкое понижение температуры на границе растение – воздух. К непроникающим криопротекторам относят сложные сахара – олигосахариды (наиболее часто используют сахарозу и трегалозу) и высокомолекулярные соединения (чаще всего фиколл, альбумин, поливинилпирролидон). Считается, что самостоятельное использование непроникающих криопротекторов менее эффективно, и обычно их включают как дополнительные компоненты в растворы, содержащие криопротекторы первой группы [4].

Из литературы известно, что для защиты растений от вымерзания можно использовать водные растворы сахаров, например, глюкозы, сахарозы и др., в которые погружают растения. Криопротекторные свойства сахаров обусловлены снижением температуры замерзания растительных тканей (при повышении содержания в них сахаров) на 8-10°C [7].

Существуют также смешанные методы, которые используют комбинацию различных типов криопротекторов для достижения максимальной эффективности. Комбинирование проникающих и непроникающих криопротекторов позволяет увеличить степень защиты клеток от повреждений [9]. Тем не менее, выбор оптимального криопротектора зависит от конкретных условий замораживания, типа клеток и желаемого конечного результата.

Глава 2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Проведение эксперимента

При проведении данного эксперимента я воспользовалась практикумом по физиологии растений [10].

Цель: показать, что защитное действие смеси глицерина и сахарозы, используемых в качестве криопротекторов, выше, чем действие их чистых растворов.

Материалы и оборудование: корнеплоды свеклы, скальпели, бритвы, термометр со шкалой от -50 до +50 С, водяная баня, электрочайник, пробирки, штатив для пробирок, химические стаканы, линейки, пробочное сверло большого диаметра (8-10 мм), соль, снег или кубики льда, 12%-ный раствор глицерина, 1М и 2М раствор сахарозы, пипетки.



Фото 1. Приготовление раствора сахарозы.

Чтобы приготовить необходимый раствор сахарозы, я взяла 342 г сахарозы, растворила в небольшом количестве воды и довела объем до 1 л. Для приготовления 2 М раствора сахарозы берут в два раза меньше воды [8]. 12% раствор глицерина мне дал учитель химии.

Для проведения опыта я использовала столовую свеклу. В клетках этого растения содержится водорастворимый пигмент из группы антоцианов – бета-цианин. Данный пигмент находится в вакуолях. Когда мы повреждаем мембрану, данный пигмент выделяется и окрашивает поверхности или воду в характерный бурый цвет.

Мне было необходимо вырезать пластинки из свеклы пробочным сверлом. Но я не нашла данный инструмент и решила использовать другую технологию. Я нарезала, используя специальную тёрку, корнеплод свеклы на длинные тонкие пластины и вырезала круглые небольшие пластинки из них, используя приспособление для удаления сердцевины из яблок. Я вырезала несколько десятков пластин из корнеплода. Все пластины были одинакового размера.



Фото 2. Вырезание пластин из корнеплода свеклы.

Затем я поместила пластины в стакан с водой и тщательно их промыла, чтобы удалить антоциан из разрезанных клеток. От данной процедуры будут зависеть результаты опыта.

После этого необходимо поместить кружочки свеклы в пробирку для дальнейшего замораживания. Я поместила по пять пластинок в каждую пробирку. Всего у меня получилось пять пробирок.



Фото 3 и 4. Промывание пластинок в воде и помещение их в пробирки.

В первую пробирку я налила дистиллированную воду; во вторую – 1М раствор сахарозы; в третью – 2М раствор сахарозы; в четвертую – 12% раствор глицерина; и в пятую – 12% раствор глицерина и 2М раствор сахарозы в соотношении 1:1. Все пробирки я пронумеровала. Количество пластинок свеклы и объём жидкости во всех пробирках одинаковые.



Фото 5 и 6. Подготовка пробирок к замораживанию.

Пробирки поместила в охлаждающую смесь: 3 части снега и 1 часть соли. Через 30 – 40 минут пробирки замёрзли.



Фото 7 и 8. Замораживание и оттаивание пробирок.

Затем пробирки ставим в ёмкость с водой комнатной температуры для оттаивания, после чего сравниваем окраску раствора в пробирках. Данный опыт проделываем три раза.

2.2. Результаты эксперимента

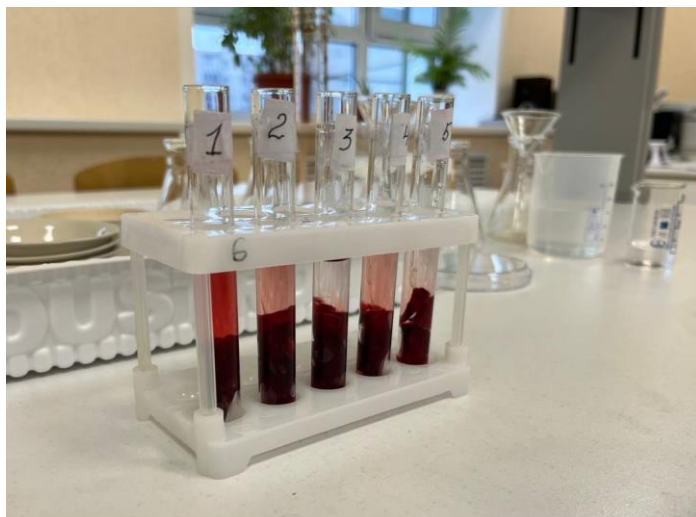


Фото 9. Первый опыт

В первой пробирке, где находится дистиллированная вода, раствор окрашен в темный бордовый цвет. Это означает, что мембраны клеток разрушены и содержимое вакуолей (антоцианы) попали в раствор и окрасили его. Самое слабое окрашивание можно наблюдать в пробирке №3 (раствор сахарозы 2М) и пробирке №5 (12% раствор глицерина и 2М раствор сахарозы в соотношении 1:1). Причем, самое слабое окрашивание наблюдается именно в пробирке №5.

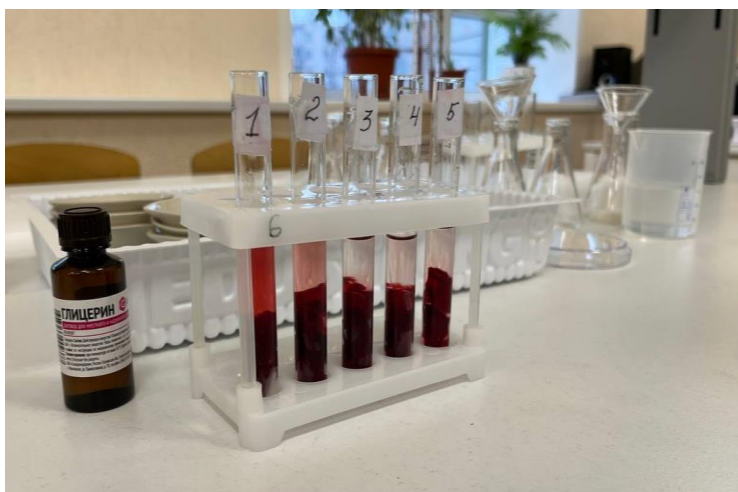


Фото 10. Второй опыт

В первой пробирке (дистиллированная вода) сохраняется самое яркое окрашивание раствора. Самое слабое окрашивание наблюдается в пробирке №5 (12% раствор глицерина и 2М раствор сахарозы в соотношении 1:1). Окрашивание в пробирках №3 (2М раствор сахарозы) и №4 (12% раствор глицерина) также достаточно слабый.



Фото 11. Третий опыт

Результаты третьего опыта показали, что окрашивание в пробирках №1 (самое сильное) и №4 (самое слабое) подтвердились. А вот раствор в пробирке №4 (12% раствор глицерина) оказался чуть более розовым, чем в пробирке №3 (2М раствор сахарозы).

Выводы по результатам эксперимента

1. В первой пробирке, где находится дистиллированная вода, раствор окрашен в темный бордовый цвет во всех трёх вариантах. Выход антоцианов из вакуолей в раствор означает, что клетки погибли, мембраны их разрушены и уже не могут удержать содержимое клетки.

2. В растворах сахарозы (пробирки 2 и 3) цвет более слабый. Можно четко отметить, что, чем больше концентрация сахарозы, тем меньше окрашен раствор. Значит сахароза оказывает защитное действие на цитоплазму клеток при их замораживании. И чем выше концентрация сахарозы, тем лучше данное воздействие.

3. С глицерином выводы не так однозначны. В первом и третьем повторении опыта окраска раствора глицерина ярче (пробирка 4), чем 2М концентрации сахарозы (пробирка 3). Во втором опыте окраска раствора в пробирке 4 более слабая.

4. Во всех трёх вариантах самое лучшее защитное свойство показала смесь из глицерина и сахарозы (пробирка 5).

Таким образом, можно сделать вывод, что защитные свойства смеси из сахарозы (концентрация 2М) глицерина (концентрация 12%) выше, чем защитное действие их чистых растворов. Глицерин и сахароза могут быть использованы в качестве криопротекторов.

Выводы

В ходе выполнения данной работы я познакомилась с новым для меня разделом биологии, подбирала и изучала специальную литературу по данной теме, провела опыты и наблюдения.

1. Увеличение количества криопротекторов в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей и тем самым приводит к повышению их морозоустойчивости.

2. Сахара, проникая в клетку и создавая там осмотическое давление, препятствуют образованию кристаллов льда и разрушению клетки в процессе замораживания.

3. Уменьшение выхода антоциана из тканей корнеплода свеклы, находившихся в растворах сахарозы, свидетельствует о том, что сахароза оказала защитное действие на цитоплазму клеток при их замораживании. Степень защитного действия зависит от концентрации сахарозы: в более концентрированном (2,0 М растворе) повреждение тканей оказалось минимальным.

4. Глицерин уменьшает разницу осмотического давления между внеклеточным и внутриклеточным пространствами при быстром замораживании.

5. Защитное действие смеси глицерина и сахарозы, используемых в качестве криопротекторов, выше, чем действие их чистых растворов.

Результаты опытов позволяют понять, почему для успешной зимовки как озимых травянистых, так и древесных растений важна солнечная осень. При пониженных ночных температурах, замедляющих отток сахаров в другие части растения, в зеленых листьях накапливаются углеводы.

Заключение

Работа рассматривает лишь один из аспектов проблем – механизм действия криопротекторов. Необходимо продолжить исследования в данном направлении и найти практическое применения криопротекторов. Кроме механизма действия криопротекторов на жизнедеятельность клеток при их замораживании, рассмотренных в данной работе, по моему мнению, было бы интересно изучить следующие моменты:

1. Криопротекторы можно использовать для повышения морозоустойчивости растений при резких понижениях температур. На данный момент, на своём приусадебном участке я провела обработку почек винограда и ежевики 25% и 40% раствором сахарозы, а также 25% и 40% раствором глицерина. При это мною был оставлен контрольный экземпляр растения. Результаты я смогу пронаблюдать после начала вегетации растений. Концентрацию криопротекторов я взяла из статьи «Регулирующая роль криопротекторов и антиоксидантов при хранении геноплазмы плодовых и ягодных культур» [11].

2. Осенью, я планирую заложить опыт по использованию криопротекторов в сочетании с агротехническими приёмами для повышения устойчивости картофеля к низким температурам. Мне хочется попробовать

осеннюю посадку картофеля, с использованием различных агротехнических приёмов и произвести обработку семенного материала криопротекторами. В отдельные годы ранние проростки картофеля могут поражаться весенними заморозками, что приводит к значительному снижению урожайности продукции. С данной технологией я познакомилась в статье «Использование криопротекторов в сочетании с агротехническими приёмами для повышения устойчивости картофеля к низким температурам» [12].

3. В моей работе не исследовано, насколько данные криопротекторы являются безопасными и в какой концентрации. Необходимо выяснить, как концентрация данных веществ может влиять на их токсичность и какие криопротекторы являются наиболее безопасными.

4. Необходимо разработать осенние подкормки, которые обеспечивают максимальное накопление сахаров и будут способствовать увеличению морозостойкости растений.

Результаты исследования заставили меня задуматься, что проблемы изменения климата могут достаточно серьёзно влиять на урожайность сельскохозяйственных культур. И, если воздействие негативное, его можно устранить или даже предотвратить.

Список использованных источников информации

1. Причины гибели растений от вымокания, вымерзания, выпирания [Электронный ресурс] // blumgarden.ru - Режим доступа: <https://blumgarden.ru/poleznoe/prichiny-gibeli-rastenij/>.
2. 4.1. Условия и причины вымерзания растений. [Электронный ресурс] // studfile.net - Режим доступа: <https://studfile.net/preview/9502126/page:7/>.
3. Анналы криобиологии. Классификации криопротекторов [Электронный ресурс] // cyberleninka.ru - Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/annaly-kriobiologii-klassifikatsii-krioprotektorov-i-kriokonservantov-dlya-kletok-krovi-i-kostnogo-mozga>.
4. Криопротекторы и антифриз натурального происхождения (АНП) – защитники растений [Электронный ресурс] // rosecatalog.ru/articles/1... - Режим доступа: <https://regnum.ru/article/3943912?ysclid=m6o616b3v4902719766>
5. «КриоМикс»: через науку в жизнь. [Электронный ресурс] <https://niva-media.ru/> Режим доступа: <https://niva-media.ru/kriomiks-cherez-nauku-v-zhizn-ili-shuba-na-mehu-ne-budet-lishnej-i-v-krymu/>
- 6.Заморозки – защита растений [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://m.ok.ru/group/53399058251903/topic/64347039779711?ysclid=m6obrnr2gt64186749>
7. Рубин Б.А. Курс физиологии растений. - М.: Высшая школа, 1976, с.546; Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкость растений. - М.: Наука, 1979, с.280).
8. Эксперименты по физиологии растений [Электронный ресурс] Режим доступа:https://labx.narod.ru/documents/experiments_in_plant_physiology.html?ysclid=m6odidxf3s593446442
9. Криопротекторы - Криомаш [Электронный ресурс] // cryomash.com - Режим доступа: <https://cryomash.com/articles/krioprotektory/>
10. Практикум по физиологии растений: учебное пособие для студентов Высш. Пед. Учеб. заведений. Под ред. В.Б.Иванова – М: Издательский центр «Академия», 2001, стр. 100-103
11. Вержук В.Г. Регулирующая роль криопротекторов и антиоксидантов при хранении геноплазмы плодовых и ягодных культур / В.Г. Вержук, А.В. Павлов, С.В. Мурашев [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. — 2016. — №11 (53). — URL: [object Object] (Дата обращения 10.04.2025). — DOI: 10.18454/IRJ.2016.53.151
12. Назаров О.М. (2022). Использование криопротекторов в сочетании с агротехническими приёмами для повышения устойчивости картофеля к низким температурам. *Conferencea*, 100–103. Retrieved from <https://conferencea.org/index.php/conferences/article/view/1217>