

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ РАПСА СОРТА АНТАРЕС

Ц.С. Гарибян, З.С. Константинов, Е.В. Захарова

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия

Рапс (*Brassica napus* L.) – ценная масличная и кормовая культура, хорошо приспособленная к умеренному климату. В России рапс является одной из перспективных масличных культур, увеличение объемов производства семян которой позволит полнее обеспечить население растительным маслом, животноводство – кормовым белком, а промышленность – сырьем.

Создание новых сортов рапса, соответствующих требованиям современного производства, во многом зависит от разнообразия исходного материала, который можно создавать с помощью методов биотехнологии. Одним из них является метод получения растений из протопластов. Отсутствие клеточной стенки у протопластов обуславливает им свойства, отличные от целых клеток. Благодаря тому, что протопласты способны поглощать макромолекулы, их используют в качестве реципиентов при трансформации.

Оценка различных факторов, влияющих на эффективность выделения протопластов, показала, что выделение протопластов растений рапса варьирует в зависимости от генотипов и типов тканей, и их необходимо индивидуально оптимизировать. В наших экспериментах для выделения протопластов растений ярового рапса сорта Антарес отбирали экспланты из мезофилла молодых листьев с асептических растений (2–3 недельного возраста), выращиваемых в условиях *in vitro*.

Ферментную обработку эксплантов, с целью получения протопластов, проводили коммерческими энзимными препаратами Cellulase 1 U/mg (SERVA) и Macerozyme R-10 (SERVA), концентрацию которых варьировали от 0,5 % до 1,5 %. Ферментный раствор готовили непосредственно перед опытом и стерилизовали в условиях ламинарного бокса с помощью шприца с насадкой Millipore через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм. В смесь помимо ферментов добавляли 0,5 М сахарозу и 5 mM CaCl₂ × 2H₂O (pH 5,7).

Инкубировали материал в термостате при температуре 28 °С. Выделенные протопласты очищали фильтрацией через нейлоновое сито с размером пор 100 мкм. Для отмывки от ферментов использовали специально подобранную, гипертоническую среду W-5, содержащую NaCl (9 г/л), CaCl₂ × 2H₂O (18,4г/л), KCl (0,8г/л) и глюкозу (1г/л) pH 5,7. Подсчёт количества выделенных протопластов в камере Горяева проводили в трёхкратной повторности по стандартной методике.

Таким образом, в ходе выполнения работы подобраны и оптимизированы условия ферментной обработки листовых эксплантов ярового рапса сорта Антарес, предназначенных для выделения протопластов. Показано, что концентрация Cellulase 1 U/mg 1 % и Macerozyme R-10 0,5 % в ферментном растворе является наиболее эффективной для получения максимального количества протопластов рапса.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0431–2019–0005 Курчатовский геномный центр ВНИИСБ № 075–15–2019–1667