

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ФЕРМЕНТНОГО РАСТВОРА НА ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS*)

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

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

В связи с ведущей ролью подсолнечника (*Helianthus annuus*), как одного из важнейших масличных культур не только в России, но и во всем мире, актуальным становится изучение методов, увеличивающих продуктивность данного растения (Якупова и др., 2018). Несмотря на большие успехи, достигнутые в области селекции, потребность в новых высокопродуктивных сортах постоянно растет и здесь немаловажную роль играет использование методов культуры клеток и тканей. Получение растений из протопластов является незаменимой технологией для генно-инженерных манипуляций (Мирошниченко и др., 2019). Оценка различных факторов, влияющих на эффективность выделения протопластов, включая генотипы, типы изолированных тканей (молодые листья и гипокотили), подбор концентрации целлюлазы, показали, что качество и количество выделения протопластов варьирует в зависимости от этих показателей, и их необходимо индивидуально оптимизировать (Kativat et al., 2012).

Цель работы – изучение влияния состава ферментного раствора на выделение протопластов подсолнечника. Получение протопластов проводили в три этапа: 1) ферментация; 2) выделение протопластов из клеточных стенок; 3) отделение протопластов от клеточных осколков.

Объектом исследований служили растения подсолнечника (*Helianthus annuus*) сорта Казачий. Для выделения протопластов подсолнечника отбирали различные экспланты (листья, семядоля, гипокотиль, эпикотиль) из 14-и дневных пробирочных растений подсолнечника (Рис. 1).

Одним из важных моментов выделения протопластов, является оптимизация концентрации ферментов, разрушающих клеточную стенку. Ферментную обработку эксплантов с целью получения протопластов проводили коммерческими энзимными препаратами Cellulase 1,8U/mg (SERVA) и Macerozyme R-10 0,71 U/mg (SERVA), количественное соотношение которых варьировало в вариантах опыта. Для защиты клеток от лизиса, после разрушения ферментами клеточной стенки, в качестве осмостабилизатора добавили сахарозу. В промывочном растворе использовали следующие соли: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, KCl, pH раствора: 5,6–5,7.

Ферментный раствор готовили непосредственно перед опытом и стерилизовали в условиях ламинарного бокса с помощью бактериальных фильтров с размером пор 0.2 мкм. После инкубации выделенные протопласты очищали от ферментного раствора и от оставшихся непереваренных кусочков тканей фильтрацией и далее центрифугировали. Промывали протопласты последующим двукратным центрифугированием в промывочном растворе, каждый раз заменяя надосадочную жидкость свежей порцией раствора. После промывки протопласты осаждались.

Оценивали эффективность выделения протопластов в зависимости от концентрации ферментов, подсчитывая количество выделенных протопластов с помощью камеры Горяева под микроскопом Primo Star Carl Zeiss (Табл. 1).

Таблица 1. Выход протопластов из листьев подсолнечника в зависимости от концентрации ферментов ($\times 10^6$, клеток/мл)

Macerozyme, % Cellulase, %	0,1	0,5	1
0,1	-	0.40	0.36
0,5	0.25	1.22	0.24
1	0.62	0.54	0.15

Оптимизация концентрации ферментов показала, что одновременное добавление 0,5 % Cellulase и 0,5 % Macerozyme наиболее эффективно, а увеличение концентрации Cellulase и Macerozyme свыше 0,5 %, приводит к резкому снижению выхода жизнеспособных протопластов. (Рис. 2)



Рис. 1. Листья подсолнечника а) до обработки ферментами; б) после ферментации

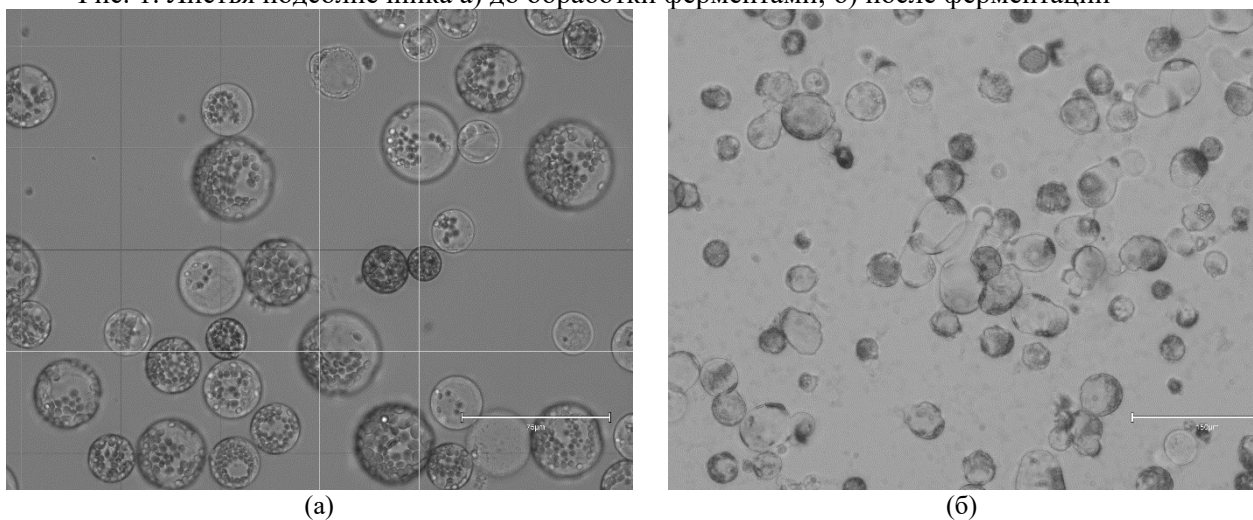


Рис. 2. Изолированные протопласты подсолнечника а) сразу после выделения б) на 3-й день после выделения, можно наблюдать первое деление. Бар = 150 мкм

Таким образом, в результате выполнения данной работы было выявлено оптимальное количество ферментов, для максимального выхода протопластов подсолнечника сорта Казачий.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Kativat C, Poolsawat O., Tantasawat P. (2012) Optimization of factors for efficient isolation of protoplasts in sunflower (*Helianthus annuus* L.) AJCS 6(6):1004–1010
- Мирошниченко, Д.Н., Шульга, О.А., Тимербаев, В.Р., & Долгов, С.В. (2019). Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом. *Биотехнология*, 35(1), 3–26.
- Якупова, А.Б., Мусин, Х.Г., & Кулуев, Б.Р. (2018). Генетическая трансформация подсолнечника с использованием *agrobacterium rhizogenes* с целью получения бородатых корней. In *Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды* (pp. 20–24).