

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ BIOTECHNOLOGY AND PLANT GENETICS

УДК 581.1: 575.2

DOI: <http://dx.doi.org/10.14258/turczaninowia.16.3.20>

М.В. Скапцов  
С.В. Смирнов  
М.Г. Куцев

M.V. Skaptsov  
S.V. Smirnov  
M.G. Kutsev

### ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ОБЛЕПИХИ (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.)

### PREPARATION OF PROTOPLASTS OF SEA BUCKTHORN (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.)

**Аннотация.** Целью исследований стало изучение влияния способа выделения протопластов на жизнеспособность интактных клеток *Hippophae rhamnoides* L. Основными задачами являлись выделение протопластов *H. rhamnoides* из каллусной массы комбинацией механического и ферментативного воздействия, а также оценка общего состояния протопластов после выделения и очистки. Объектом исследований стали клетки мезофилла и экспланты мезофилла листа, введенные в культуру *in vitro*. Предполагается, что значительные повреждения при механическо-ферментативном способе выделения достигаются не только за счет механических воздействий, но и вследствие выделения полифенольных продуктов жизнедеятельности и распада компонентов клеток. Кроме того, протопласты каллусов являются дедифференцированными и позволяют упростить процесс специализации клеток при проведении различных селекционных и биотехнологических процессов. В результате был установлен оптимальный метод выделения протопластов *H. rhamnoides* со сниженным уровнем повреждения клеток. Установлено, что важными факторами для максимального выхода протопластов является подбор концентраций D-маннита, выступающего в качестве осмотически активного вещества; подбор концентраций мацерозима R10 и целлюлазы R10; использование тиосульфата натрия в качестве антиоксиданта, а также подбор времени инкубации листовых эксплантов на среде с ферментами.

**Ключевые слова:** протопласт, мезофилл, фитогормоны, ферменты, каллус, *Hippophae rhamnoides*.

**Summary.** The aim of research was to study the effect of a method of protoplast isolation on *Hippophae rhamnoides* cell viability. The main objectives were the release of protoplasts *H. rhamnoides* from callus tissue by a combination of mechanical and enzymatic effects, as well as evaluation of the general state of isolated cells after isolation and purification. The objects of studies were mesophyll cells and leaf mesophyll explants introduced in culture *in vitro*. It is assumed that considerable damage of cells in the process of mechanical-enzymatic treatment is not only a result of mechanical impact, but also an effect of the release of metabolic products (polyphenolic components) of cells and their decay. Also protoplasts are dedifferentiated and simplify the process of differentiation in various breeding and biotechnological experiments. As a result of the work, an optimized method of *H. rhamnoides* protoplast isolation with decreased levels of cell damage is set up. It is revealed that important factors for high yield of viable protoplasts are: proper concentration of D-mannite as an osmoticum; proper concentration of cellulase R10 and macerozyme R10; use of sodium tiosulfate as an antioxidant; proper time of incubation of leaf explants in medium with enzymes.

**Key words:** protoplast, mesophyll, plant hormones, ferments, callus, *Hippophae rhamnoides*.

В современном мире биомасса растительных клеток широко используется для научных исследований в биотехнологических процессах, а развитие новых технологических приемов выращивания растений-продуцентов биологически активных веществ (БАВ) приобретает приоритетное значение в связи с нарастающей нагруз-

кой на дикорастущие растительные ресурсы. С целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур в протопласты можно относительно просто ввести чужеродную ДНК и даже компоненты клеток (Бекер, 1990). Для этого необходимо получить протопласты с неповрежденными органеллами, сохраненными

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия  
Altai State University, Lenina str., 61; 656049, Barnaul, Russia; e-mail: m\_kucev@mail.ru

Поступило в редакцию 03.10.2013 г.  
Принято к публикации 21.10.2013 г.

Submitted 03.10.2013  
Accepted 21.10.2013

функциями плазматической мембраны и процессами метаболизма. Несомненно, что выращивание растений-продуцентов БАВ и поддержание устойчивого уровня продуктивности путем применения технологии культуры клеток и тканей с дополнительными биоинженерными целями решают проблему нехватки лекарств и пищевых продуктов для растущего народонаселения Земли (Julsing et al., 2006).

Развитие техники получения протопластов в культурах клеток и тканей растений способствует увеличению универсальности использования растений как в биохимических, так и в генетических исследованиях (Krautwig, Lorz, 1995). Технологии культивирования протопластов особенно ценны для проведения манипуляций с растениями *in vitro*, таких как генноинженерные операции, парасексуальная гибридизация и производство вторичных метаболитов, что особенно актуально в отношении экономически значимых видов, для которых невозможна регенерация *in vitro* (Guo et al., 2012; Lin et al., 1987).

**Материалы и методы.** Протопласты выделяли из молодых листьев распустившейся почки дикорастущей облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.), происходящей из Республики Алтай (окр. с. Акташ). У данного вида затруднена возможность удаления нижнего эпидермиса, что способствовало бы доступу смеси ферментов к клеткам мезофилла листа. В связи с этим протопласты выделяли комбинированным способом: механическим – измельчением листовых пластинок с помощью тонкого лезвия, и энзиматическим – последующей обработкой ферментами. Для изоляции клеток использовали 5 см<sup>2</sup> мезофилла листа. Листья промывали 70%-ным спиртом и далее дополнительно стерилизовали 1%-ным раствором гипохлорита натрия. После тщательной промывки листьев стерильной дистиллированной водой, листья подсушивали в потоке воздуха ламинар-бокса и измельчали. Проводили скрининговые исследования для поиска оптимальных концентраций ферментов и осмолитика для максимального выхода жизнеспособных клеток. Для этого переносили измельченные листья в бюкс, на поверхность 1 мл питательной среды Гамборга, содержащей D-маннит (Sigma-Aldrich GmbH, Германия) вместо сахарозы в концентрациях от 50 до 70 г/л. Так же производили подбор концентраций ферментов: целлюлазы Onozuka R10 (Serva Electroforesis GmbH, Германия), мацерозима R10 (Serva Electroforesis GmbH, Германия) и Zimorougé (So-

dinal France, Франция) – коммерческой смеси ферментов, включающей пектиназу, гемицеллюлазу, полигалактуронидазу, пектинэстеразу. Для предотвращения заражения бактериями в смесь ферментов вносили антибиотик цефотаксим в концентрации 200 мкг/мл. Инкубировали в темноте при 25°С в течение 16–18 часов (Дрейпер и др., 1991). После инкубации встряхивали бюксы с листьями для освобождения клеток и удаляли большие агрегаты дебриса из суспензии стерильным пинцетом, после фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 60 мкм. Полученную суспензию центрифугировали при 400 об./мин. в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде Гамборга и центрифугировали повторно для отмывки клеток от ферментов. Суспензию высаживали в виде капель на поверхность твердой питательной среды Гамборга. Исследовали с использованием инвертированного микроскопа.

Кроме того, для получения протопластов, использовали метод выделения клеток из каллусной массы. Культивирование *in vitro* протопластов и органов растений осуществляли согласно общепринятым рекомендациям (Бутенко, 1999) с различными вариациями. На различных этапах экспериментальной работы использовали питательную среду Гамборга (SigmaAldrich, GmbH) с добавлением 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля (SigmaAldrich, GmbH) (Murashige, 1962). Дополнительно, для снижения эффекта накопления полифенолов, в питательную среду вносили дитиотреитол, гидролизат казеина и поливинилпирролидон в концентрации, соответственно, 0,06, 1 и 5 г/л. Поверхностную стерилизацию листьев проводили в течение 15 мин. в 0,5%-ом растворе гипохлорита натрия (Stewart, 2008). В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза была использована область по периферии центральной жилки листа *H. rhamnoides*, которую делили на фрагменты и помещали на питательные среды.

Для индукции и поддержания каллусогенеза, экспланты культивировали на твердой питательной среде Гамборга с добавлением ауксинов и цитокининов в следующих концентрациях: 0,5 мг/л бензиладенина-6 (SigmaAldrich, GmbH), 0,5 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) (SigmaAldrich, GmbH). Каллусогенез индуцировали в условиях в климатической камере (КС-200, СКТЬ) с фотопериодом день (8 ч.) : ночь (16 ч.) и температурой 23°С. Субкультивирование осуществляли через 14 суток. После этого рыхлую часть каллуса переносили в жидкую питательную среду Гамборга с комплексом

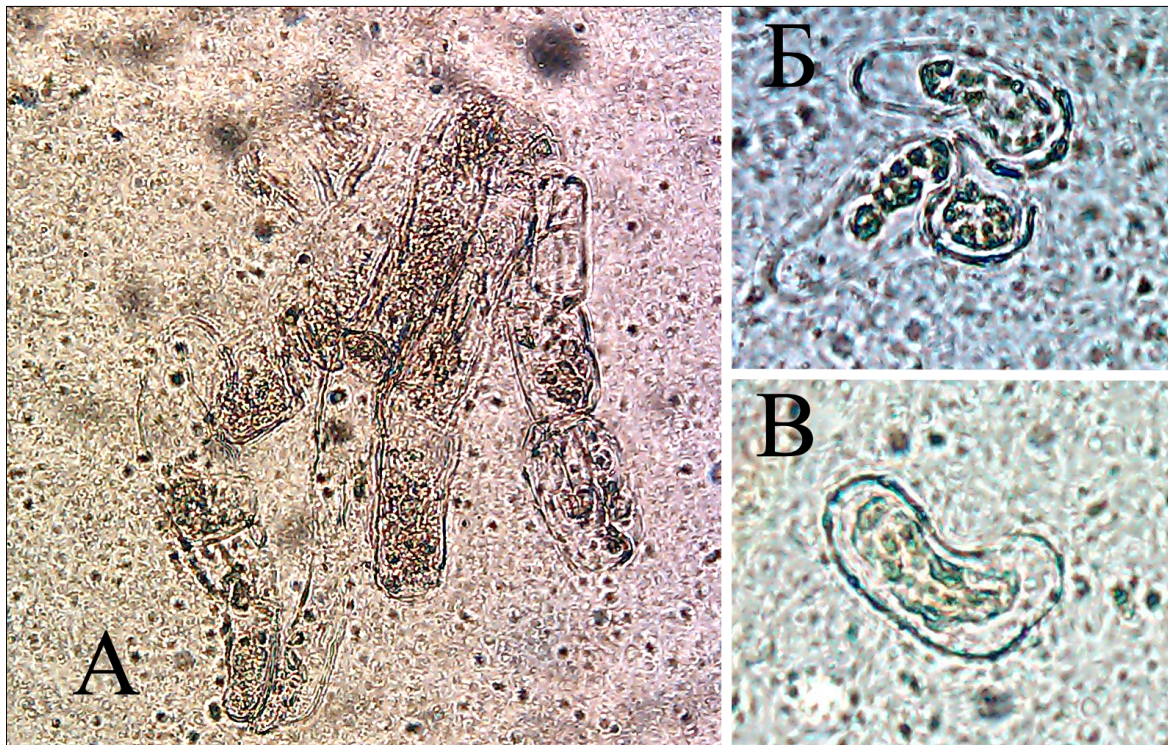


Рис. 1. Протопласты мезофилла листа *Hippophae rhamnoides* L.: А – скопление протопластов после ферментативного гидролиза клеточной стенки; Б, В – восстановление клеточной стенки.

ферментов. Культивировали при тех же условиях на качалке в течение 16 ч. После инкубации суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 100 мкм. Суспензию очищали от ферментов центрифугированием с ресуспендированием в жидкой питательной среде Гамборга. Суспензию высаживали в виде капель на поверхность твердой питательной среды.

**Результаты и обсуждение.** Существенным моментом, обеспечивающим выделение максимального количества клеток, является правильное сочетание ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, а также поддержание клетки в состоянии плазмолиза путем создания повышенного осмотического давления снаружи клетки. Как показали результаты наших

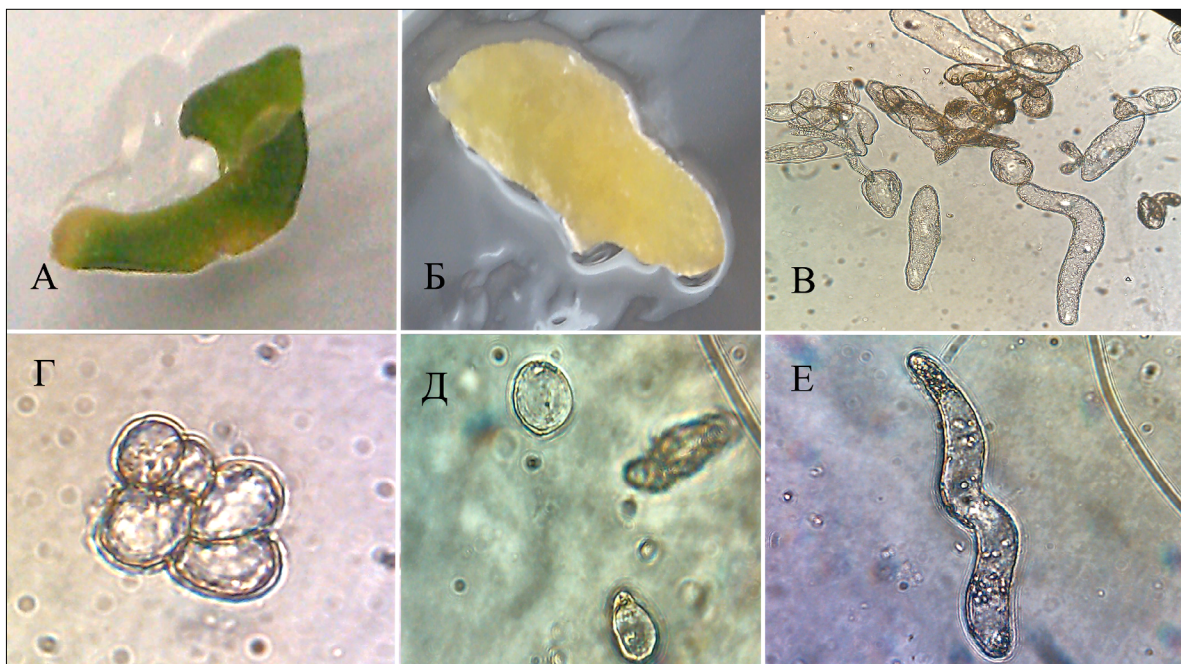


Рис. 2. Протопласты *Hippophae rhamnoides* L.: А – листовой эксплант; Б – каллус; В – формирование скоплений клеток и образование клеточной стенки; Г, Д – фенотипы протопластов, Е – клетка с восстановленной клеточной стенкой.

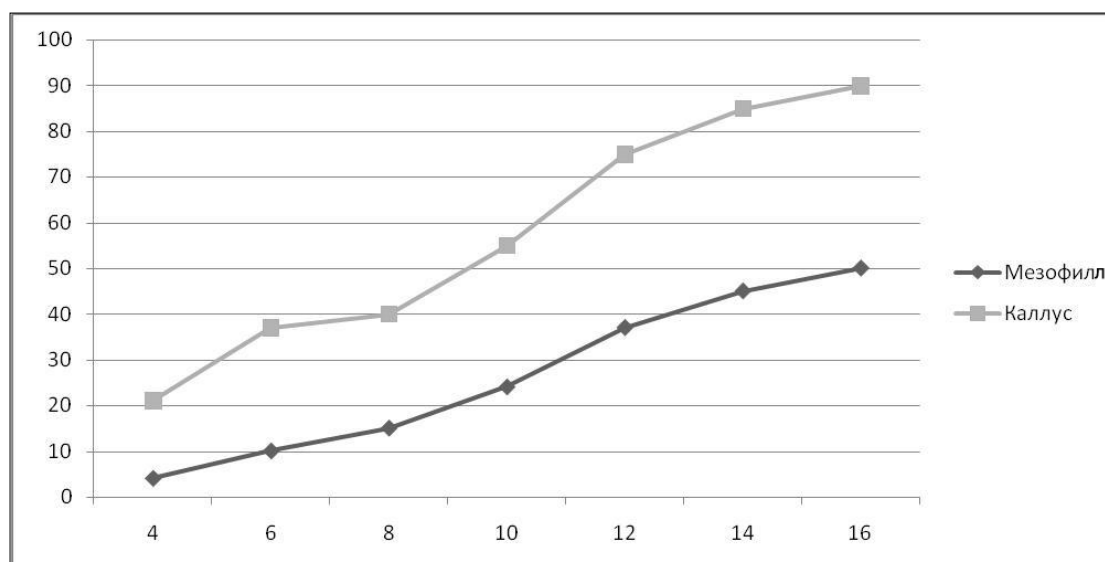


Рис. 3. Зависимость выхода протопластов от длительности инкубации: ось X – время инкубации, часов; ось Y – количество клеток, кл. с 1 см<sup>2</sup> мезофилла листа.

исследований, максимальное количество клеток *H. rhamnoides* в количестве до 50 клеток с 1 см<sup>2</sup> листа выделяется при концентрации целлюлазы, равной 5 г/л, мацерозима – 2 г/л и D-маннита – 70 г/л.

Жизнеспособность протопластов, полученных энзиматическим способом из мезофилла листа *H. rhamnoides*, коррелировала с условиями изоляции. Среди них присутствовало множество клеток с поврежденной клеточной стенкой, не поддающихся деплазмозису (рис. 1).

Напротив, протопласты *H. rhamnoides*, полученные из каллусной массы, легче перенесли процесс изоляции и быстрее восстанавливались в осмотически нейтральной для них среде, но представлены были клетками различной формы вследствие быстрого восстановления клеточной стенки (рис. 2).

Зависимость количества клеток от длительности культивирования и способа выделения исследовали при 25° С в темноте в среде Гамборга с концентрацией ферментов 5 г/л (цел-

люлаза), 2 г/л (мацерозим) и 70 г/л (D-маннит) (рис. 3).

Учитывая данные о повреждении клеток при различных способах выделения, оптимальным для выделения протопластов *H. rhamnoides* является использование каллусной массы. Предполагается, что значительные повреждения при первом способе выделения достигаются не только за счет механических воздействий, но и вследствие выделения полифенольных продуктов жизнедеятельности и распада компонентов клеток. Отмечено относительно быстрое восстановление клеточной стенки и формирование скоплений клеток. Кроме того, протопласты, выделенные из каллусной массы, являются дифференцированными и позволяют упростить процесс дифференциации при проведении различных селекционных и биотехнологических работ.

Исследования проведены при поддержке Министерства образования и науки РФ, проект 14.B37.21.0110.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бекер М.Е.** Биотехнология. – М.: Агропромиздат, 1990. – 451 с.
- Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Дрейнер Д., Скотт Р., Армитадж Ф., Уолден Р.** Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
- Guo J., Morrell-Falvey J., Labbé J.L., Muchero W., Kalluri U.C., Tuskan G.A., Chen J.** Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays // PLOS ONE, 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 1–8.
- Julsing M.K., Quax W.J., Kayser O.** Engineering of medicinal plants – prospects and limitations of medicinal plant biotechnology // Medicinal plant biotechnology – from basic research to industrial. – Weinheim, 2006. – P. 4–8.
- Krautwig B., Lorz H.** Cereal protoplasts // Plant Science, 1995. – Vol. 111. – P. 1–10.

**Lin W., Odell J.T., Schreiner R.M.** Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts // *Plant Physiol.*, 1987. – Vol. 84, № 3. – P. 856–861.

**Murashige T.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*, 1962. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.

**Stewart C.N.J.** *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications.* – New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. – 352 p.

**Zhu L., Wang B.C., Zhou J., Chen L.X., Dai C.Y., Duan C.R.** Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005. – Vol. 44. – P. 1–5.