

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ЛЮЦЕРНЫ ЖЕЛТОЙ (*MEDICAGO FALCATO*)

Турпанова Р.М.

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г.Астана, Казахстан

Киргизова И.В.

Омский государственный технический университет, г.Омск, Россия

(Irina.kz-89@mail.ru)

В ходе исследований было изучены условия для выделения и культивирования протопластов люцерны желтой, в качестве минеральной основы использовали среды Гамборга-Эвеленга В5, Ушмия-Мурасиге, Мурасиге-Скуга и Шенка-Хильдебрандта, а индукторами получения каллусогенеза выступали НУК и 2,4-Д. Были оптимизированы питательные среды для культивирования протопластов.

В последние годы интерес к люцерне на всех континентах земного шара значительно возрос. Высокая продуктивность, высокопитательная зеленая масса, рекордный выход дефицитного белка с единицы площади, способность давать хорошие урожаи без внесения больших доз минеральных удобрений обеспечивают высокую сельскохозяйственную ценность люцерны

Кроме того, люцерна используется в качестве культуры рассолителя при вторичном засолении почв, является хорошим медоносом, уменьшает губительное действие водной и ветровой эрозии. Несмотря на большие успехи, достигнутые в области селекции, потребность в новых высокопродук-

тивных сортах постоянно растет. И здесь немаловажную роль играет использование методов культуры клеток и тканей, и введение дикорастущих видов в культуру.

Для преодоления затруднений, связанных с большими затратами времени для получения нового сорта, а также ограниченности возможностей полового скрещивания применяют новое направление научных исследований – биотехнология растений, использующая целый ряд методов для получения сортов с заранее заданными свойствами. Из многочисленных современных микроинженерных методов, используемых в растениеводстве, является клеточная технология в культуре *in vitro*, связанные

с генетическими манипуляциями на клетках и изолированных протопластов с целью создания направленного генетического разнообразия исходных форм [1].

С целью изучения возможности получения клеточных клонов различных форм люцерны, и получения фото-автотрофной ткани, происходящей из настоящих листьев, были проведены эксперименты по выделению протопластов и регенерации из них целых растений.

Одним из важных моментов выделения протопластов, является оптимизация концентрации ферментов разрушающих клеточную стенку. Методика с добавлением целлюлазы и мацерозима одновременно, значительно облегчает процесс выделения протопластов, так как они меньше время подвергаются ферментативной обработке, и, соответственно, увеличивается их жизнеспособность [2].

Оптимизация концентрации ферментов показала, что увеличение концентрации целлюлазы свыше 1.5 % и мацерозима свыше 0.15 % приводит к резкому снижению жизнеспособности протопластов.

В то же время общее количество протопластов увеличивается при дальнейшем возрастании концентрации ферментов. Установлено, что оптимальная концентрация для целлюлазы 1 % и мацерозима 0.1 %.

Важную роль при получении протопластов играет подбор осмотического стабилизатора. Для поддержания клеток в осмотически стабильном состоянии необходимо чтобы ферментативный рас-

твор был изотоническим или гипертоническим. Концентрация маннитола необходимая для успешной изоляции протопластов находится в пределах 0.45-0.5 моль, и, следует отметить, что увеличение концентрации свыше 0.5 М не приводит к заметному улучшению процесса выделения протопластов.

Поскольку время инкубации напрямую влияет на жизнеспособность культуры протопластов, было определено, что оптимальное время обработки ферментами находится в пределах 8-10 часов. Дальнейшая обработка приводит не только к снижению жизнеспособности протопластов, но и к уменьшению их количества, вероятно, вследствие разрушения ферментами клеточных мембран [3].

После инкубации, суспензию пропускали через нейлоновое сито и центрифугировали при 100 g 5 минут в 0,5 М растворе маннитола, где протопласты осаждались на дно, за тем ферментативная смесь сливалась, осадок ресуспендировали в 5 мл промывочной среды и центрифугировали. Процедуру повторяли 3 раза. Затем 2 мл суспензии протопластов помещали в 15-ти миллилитровую стеклянную центрифужную пробирку, содержащую 9-10 мл флотационной среды. Пробирку отстаивали в течение 15 минут и затем центрифугировали при 160 g 10 минут

Протопласты в 17 % сахарозе образовывали чистую прослойку и отбирались пастеровской пипеткой. Для восстановления осмотического равновесия протопласты помещали на 30 минут в промывочную среду в темноте (рис. 1).

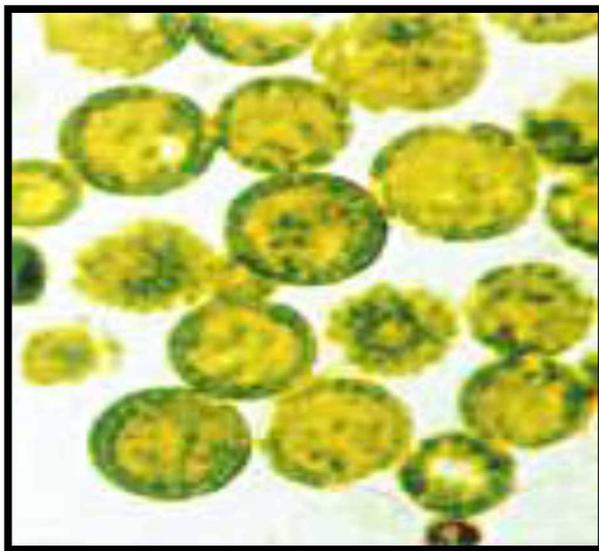


Рисунок 1 Изолированные протопласты люцерны

После очистки и флотации протопласты помещали в 2 мл модифицированной жидкой среды 8E без регуляторов роста в 60 мм чашке Петри (табл.1). Среда содержит сахарозу для роста и маннитол, который является не только осмотическим стабилизатором, но и компонентом клеточной стенки. Плотность культивируемых протопластов составляла 2×10^4 на один миллилитр среды. Куль-

тивирование проводили в темноте, при $t 25^{\circ}\text{C}$, в течение 2 недель и затем переносили на свет с интенсивностью 2000-3000 люкс

Модификации среды 8E, использованные для выделения и культивирования протопластов люцерны

Компоненты	Промывочная среда мг/л	Флотационная среда мг/л	Культивационная среда мг/л
Соли по МС без NH ₄ NO ₃	+	+	+
KNO ₃	1900	1900	1900
Мезоинозит	2000	2000	2000
L-глутамин	100	100	100
Гидролизат казеина	20	20	20
Тиамин-HCl	10	10	10
Глицин	2	2	2
Никотиновая Кислота	0,5	0,5	0,5
L-серин	0,1	0,1	0,1
Сахароза	-	17000	1400
Маннитол	9000	-	9000
pH	5,7	5,7	5,7

Периодически контролировали жизнеспособность протопластов и восстановление ими клеточной стенки. Через 1 неделю культуру перенесли на среду МС с добавлением 2,4-Д 2 мг/л и кинетина 0.2 мг/л, где наблюдали образование микрокаллусов после 1-го месяца культивирования. В дальнейшем эти каллусы использовались для получения растений регенерантов.

Таким образом, применение данной методики выделения позволяет получать жизнеспособные протопласты люцерны способные к регенерации целого растения с достаточно высоким выходом 2×10^6 .

Для выделения протопластов из листьев люцерны наиболее оптимальным был ферментный

состав, содержащий: целлюлазу- 1%, мацерозим - 0.1% и осмотик - маннитол в концентрации 0.45-0.5 моль, с высокой жизнеспособностью (76,0—82%) составил от 2×10^4 прот/мл.

Литература

1. Артамонов В.И. Биотехнология - агропромышленному комплексу. М.: Наука, 1989. 160 с.
2. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф., Клеточная инженерия. - М.: Высшая школа, 1987, 120 с
3. Nabors M.W., Heyser J.W., Dykes T.A., De Mot K.J. Long-duration high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures//Planta.-1983,-V.157,-№5,-P.385-391