

- **Протопласты растительных клеток как объекты биологического конструирования**
- *Способы выделения растительных протопластов*
- Протопласты растений – это клетки, лишенные целлюлозной оболочки, т.е. ограниченные мембраной цитоплазматические образования, несущие внутриклеточные органоиды и характеризующиеся структурной целостностью и способностью осуществлять активный метаболизм и выполнять биосинтезы и трансформацию энергии.
- Термин был использован Д. Ханстеином (Ганштейном) в 1880 г. для обозначения морфологически обособленных образований при плазмолизе.

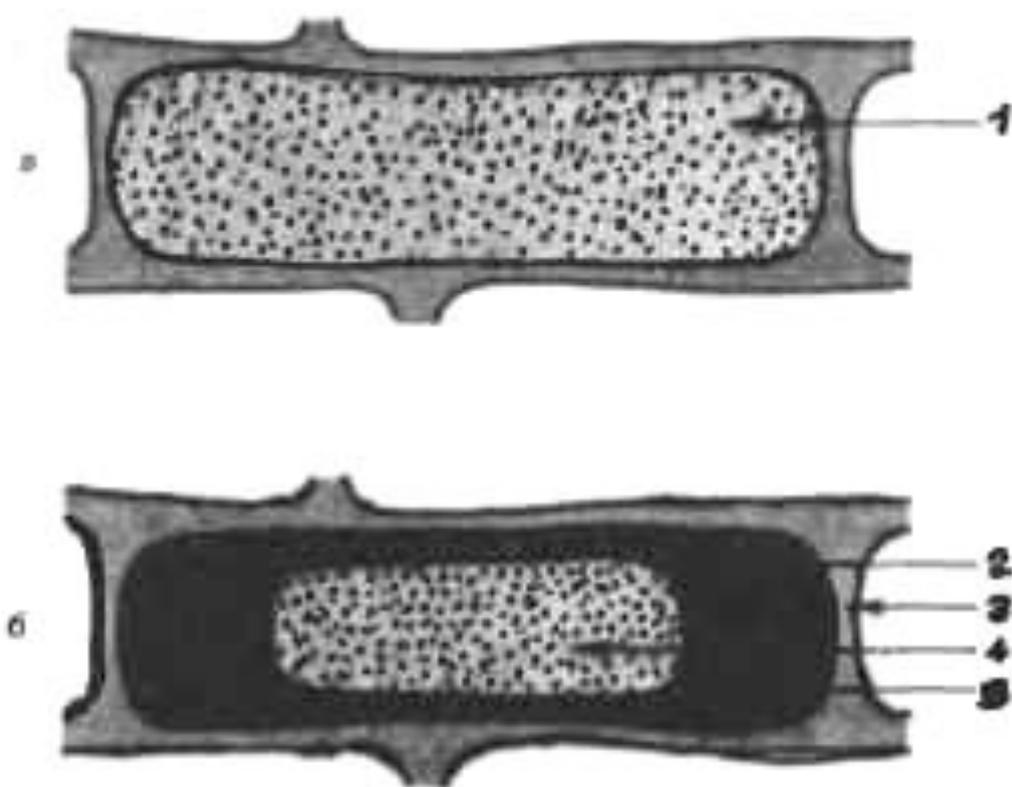


Рис. 11. Плазмолиз в клетке (по Гэлстон и др., 1983): а — тургоресцентная клетка; б — плазмоллизированная клетка:

1 — протопласт прижат к клеточной стенке давлением, создаваемым центральной вакуолью; 2 — концентрированный раствор; 3 — клеточная стенка; 4 — сжавшийся протопласт; 5 — клеточная мембрана

- Впервые выделение растительных протопластов было осуществлено в 1892 г. **Дж. Клеркером** при изучении плазмолиза в клетках водного телореза (*Stratiotes aloides*) при механическом повреждении ткани.
- Данный способ выделения протопластов получил название **«механический»**.

- *Механические методы* получения растительных протопластов являются наиболее простыми, но длительными и трудоемкими. При этом фрагмент растительной ткани вносят в 0,1 М раствор сахарозы, более концентрированный, чем вакуолярный сок, выдерживают определенное время до тех пор, пока протопласты не сожмутся и не отойдут от клеточных стенок, а затем аккуратно рассекают эпидермис, и протопласты выходят в среду. Однако при применении даже модифицированных механических методов, можно получить только ограниченное число протопластов, и, в этом случае, можно использовать только те ткани, в которых возможен экстенсивный плазмолиз (получить протопласты из меристемы или зрелой ткани очень сложно). Метод трудоемкий и длительный.

- Принципиально отличающийся метод получения изолированных протопластов - *энзиматический*. В этом случае для удаления клеточной стенки используются гидролитические ферменты. Изолирование протопластов из клеток высших растений с использованием ферментов впервые было успешно осуществлено **Е.Кокингом в 1960 г.** (после того, как **Салтон** успешно получил бактериальные протопласты под действием лизоцима в 1952 г.). Он удачно применил ферментный препарат из культуральной жидкости гриба *Myrothecium verrucaria* для получения больших количеств изолированных протопластов из кончиков корней томатов.

- В сравнении с механическим методом ферментативное выделение протопластов имеет определенные преимущества:
- 1) одновременно можно получить большое количество протопластов (до 10 млн. из грамма ткани или массы клеток),
- 2) протопласты не подвергаются сильному осмотическому сжатию,
- 3) клетки более интактны и не повреждены,
- 4) метод сравнительно быстрый.

- Оптимальные условия для выделения протопластов очень индивидуальны для разных тканей. В каждом случае необходима предварительная работа по подбору состава ферментов, их концентрации и соотношения, а также продолжительности обработки клетки и ткани ферментами. Выделяющиеся протопласты должны находиться в контакте с ферментом минимальное время и затем тщательно отмыты от них. Стерилизацию раствора ферментов производят через бактериальные фильтры.

- Для удаления клеточной стенки обычно используются ферментные препараты трех типов - **целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы** – чаще всего грибного или бактериального происхождения.
- Выбор ферментной системы (комбинация ферментов и их соотношение) производится на основании знаний об особенностях растительных тканей.
- Время выделения протопластов зависит от концентрации ферментов. При высоких концентрациях - продолжительность составляет 1-4 часа, при невысоких – 12-20 часов. Инкубация с ферментами в колбах осуществляется при медленном круговом вращении.

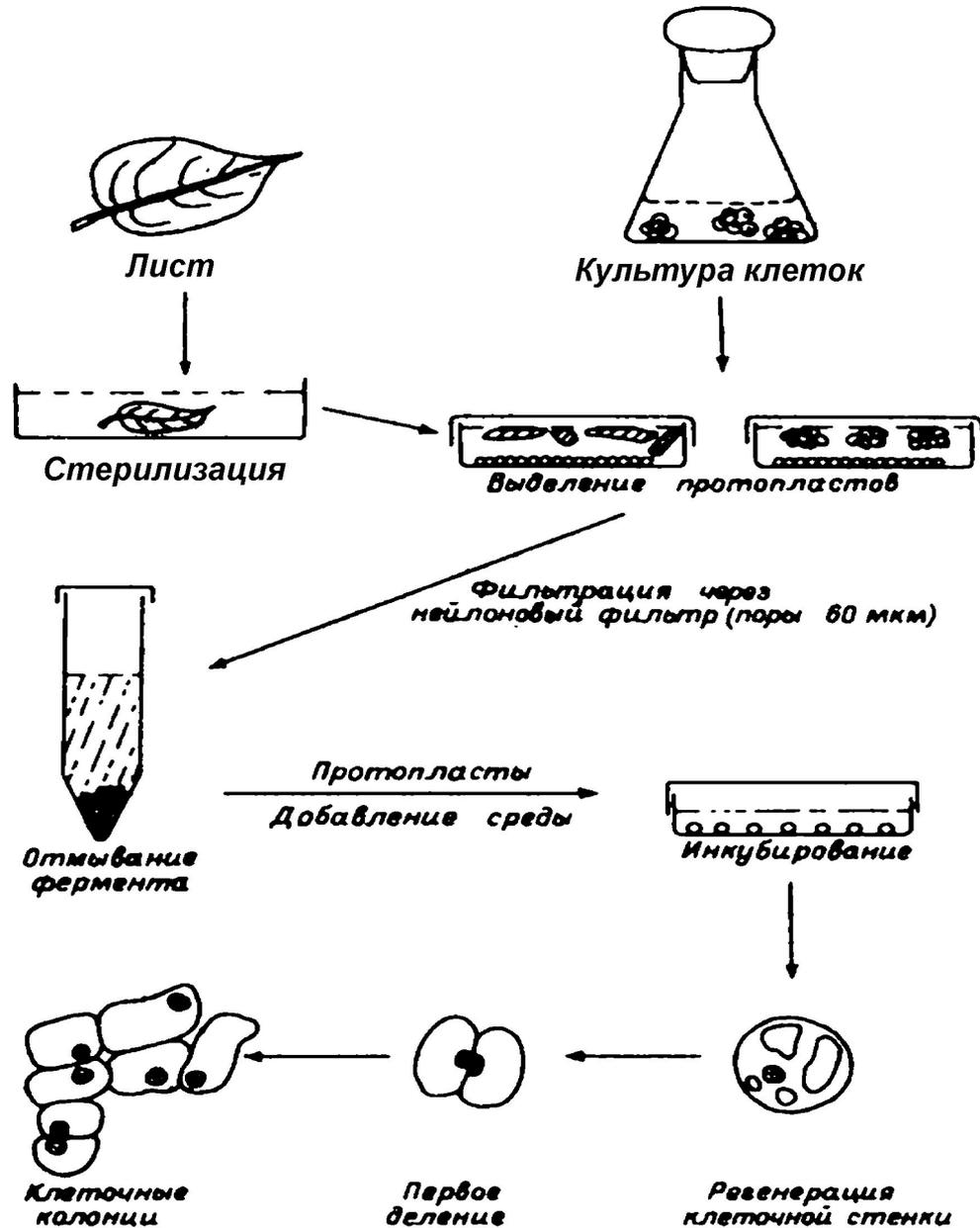
- Важное значение имеют осмотические свойства среды выделения, собственно как и среды культивирования. Среда должна быть немного гипертонической, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Эти условия тормозят метаболизм и регенерацию клеточной стенки.
- Неправильный выбор осмотических агентов может привести к разрыву плазмалеммы и лизису протопластов или к спонтанному их слиянию, сопровождающемуся образованием многоядерных клеток.
- В качестве осмотических стабилизаторов используют сахара (глюкозу, сахарозу маннит, сорбит, ксилозу), ионные осмотики (CaCl_2 , KCl). Концентрации подбираются индивидуально для каждого растительного объекта.
- Оптимальными для выделения протопластов являются 0,1-0,8 М растворы стабилизаторов осмотического давления.

- В качестве осмотически активных веществ чаще используют *сахара*. При этом *маннит* предпочтительнее, чем *сорбит*, т.к. он обладает слабой проникающей способностью. Проникновение в клетки *сорбита* может сопровождаться проникновением гидролитических ферментов, чего следует избегать. Возможно, применение *смеси сорбита и маннита*. *Глюкоза и сахароза* активно проникают через мембрану, однако их обычно используют при получении протопластов, поскольку их растворы создают условия, близкие к условиям культивирования клеток.
- Для некоторых тканей применение растворов сахаров не дает желаемых результатов. В этом случае в качестве регуляторов осмотического давления используют *растворы солей*. Однако необходимо помнить, что соли обладают более высокой проникающей способностью, чем сахара, и могут снижать активность некоторых гидролитических ферментов. Растворы солей часто используют в качестве основы при действии других осмотически активных веществ.

- **Условия изолирования: рН среды 5,4 - 6,2, температура от +14 (пшеница) до +28 оС (томат), в темноте или при невысокой освещенности (не более 2000 лк).**
- В результате обработки тканей ферментными препаратами образуется смесь, содержащая протопласты, обломки разрушенных клеток и целые клетки. Чтобы отделить протопласты от примесей, суспензию либо фильтруют через нейлоновые фильтры, а затем центрифугируют в мягких условиях, либо подвергают флотации.

- Источником клеток для получения протопластов помимо фрагментов растительных тканей являются также клеточные суспензии и каллусные культуры. Схема общей процедуры изоляции протопластов та же, однако, в этом случае нет необходимости в стерилизации исходного материала.

Рис. Схема общей процедуры получения растительных протопластов



- Выделение протопластов достаточно легко выполнимая и технически хорошо отработанная процедура, однако получить жизнеспособные протопласты непросто и также непросто их в дальнейшем культивировать.
- **Успех процесса зависит от многих факторов – состава ферментов, их качества, рН среды, выбора осмотического раствора. Большое значение при этом имеет состояние растительного материала, а именно, его видовая, генетическая, энергетическая и физиологическая характеристики, а также применяемые методы получения и культивирования протопластов.**

- Для стабильного получения большого количества протопластов важны стандартные условия выращивания исходных растений или клеток, определение оптимального для выделения протопластов возраста растения или органа, температуры, освещения, питания.
- Для получения протопластов из суспензионных и каллусных культур наилучшей является поздняя логарифмическая фаза роста, когда клеточные стенки лучше всего поддаются ферментативному разрушению, а протопласты наиболее жизнеспособны.

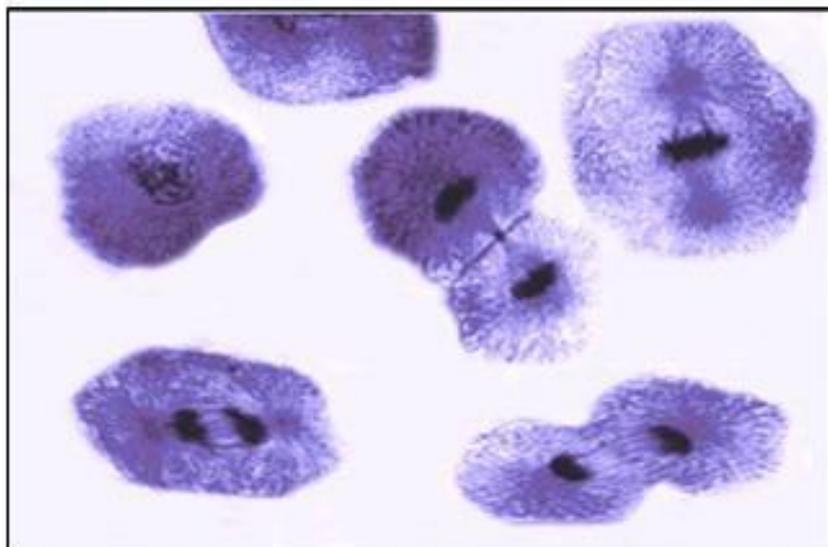


Рис. 3.4. Каллусные клетки в разные фазы роста

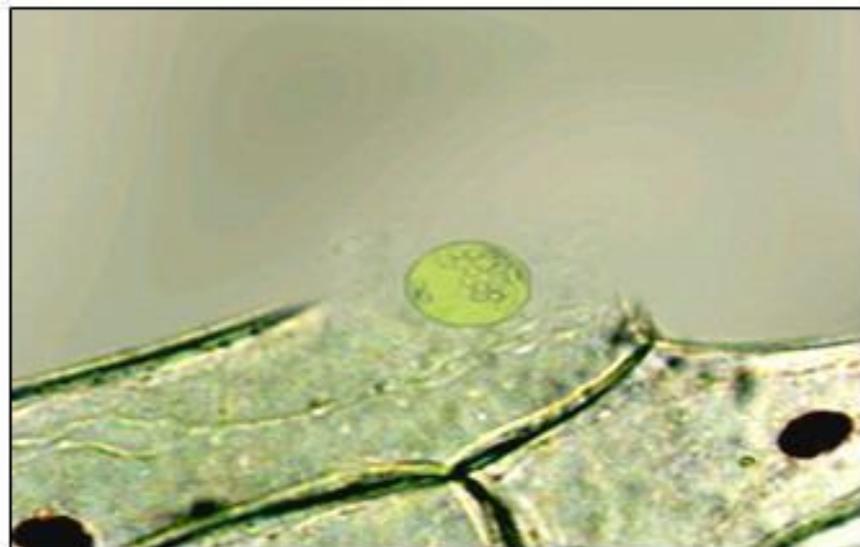


Рис. 3.5. Выход протопласта через поврежденную стенку клетки

- Однако существенным неудобством применения культивируемых клеток как исходного материала для выделения протопластов состоит в том, что такие культуры часто имеют нестабильное число хромосом. Большинство долго культивируемых линий содержат смесь эуплоидных и анеуплоидных клеток (последние обычно не способны к регенерации растений). Это приводит к существенному снижению частоты регенерации растений из изолированных протопластов.
- **Эванс и коллеги в 1982-3 гг.** (Evans E., Gamborg O., 1982; Evans E., Bravo J., 1983) разработали метод, формирующий хромосомную стабильность в используемых для изоляции протопластов клеточных культурах. В качестве определяющих факторов они указали три:

- 1. Важен эксплантат, который используется для получения клеточной культуры. Например, ткани листа или ткани молодых побегов имеют более высокое содержание диплоидных клеток, чем ткани сердцевины.
- 2. На число хромосом культивируемых клеток влияет концентрация регуляторов роста. Так, высокие концентрации кинетина способствуют возникновению полиплоидии.
- 3. Для полученной диплоидной культуры важно поддерживать селективные условия, которые благоприятствовали бы доминированию данной популяции.
- Протопласты, изолированные из стабильной клеточной культуры, с большей вероятностью регенерируют растения и более полезны для исследования генетической модификации протопластов, особенно их слияния.

- Чтобы получить жизнеспособные протопласты в ряде случаев применяют предшествующую подготовку материала, например, выдерживают растительную ткань в темноте в течение нескольких часов в присутствии осмотиков, чтобы вызвать предварительный плазмолиз и сократить время инкубации в ферменте.
- Иногда растение на некоторое время помещают в темноту или на короткое время на яркий свет.

- Для успешного выделения протопластов из *Nicotiana tabacum* оптимальными являются следующие условия выращивания растений: температура 22 °С, освещенность 10 000-20 000 лк в течение 15 ч, еженедельная подкормка азотом. Наиболее благоприятный возраст растения 40-60 сут.

- **Выделение протопластов из листа:**

- Главные отличия методики при работе с листьями заключаются в том, что листовая ткань освобождается от эпидермиса.
- **Стандартная методика выделения протопластов (по Такебе) из мезофильных тканей листа *Nicotiana tabacum*:** Полностью сформировавшийся лист отделяют от здорового растения в возрасте 20-80 дн, промывают проточной водой, затем ополаскивают дистиллированной; на 0,5-1 минуту окунают в 70%-ный этанол и помещают после этого на 15-20 мин в 10%-ный раствор гипохлорита кальция (или на 3-5 минут в 5% раствор). Затем лист несколько раз промывают в стерильной дистиллированной воде, подсушивают и помещают на фильтровальную бумагу нижним эпидермисом вверх. Осторожно с помощью скальпеля и глазного пинцета снимают эпидермис, нарезают на небольшие фрагменты площадью примерно 2-4 см² и помещают в раствор фермента, так, чтобы ткань плавала на поверхности фермента и не тонула, при этом та часть листа, с которой удален эпидермис, должна контактировать с ферментным раствором. Из очищенной от эпидермиса листовой ткани протопласты извлекаются **двухступенчатой энзиматической обработкой**. На первом этапе используют раствор **пектиназы**, который осуществляет мацерацию ткани, и затем, на втором этапе, клетки обрабатывают **целлюлазой**, окончательно разрушающей целлюлозные клеточные стенки. Оптимальная концентрация ферментов, как и время обработки, индивидуальны для разных тканей.

- Вместо последовательного воздействия пектиназой и целлюлазой растительные клетки можно одновременно обрабатывать смесью этих ферментов – *одноступенчатая энзиматическая обработка* (J. Power, E. Cocking, 1969). Для этого листовую ткань без эпидермиса помещают непосредственно в ферментативную смесь, содержащую 0,5% раствор пектиназы и 2% раствор целлюлазы в 0,7 М растворе сорбита или маннита.
- Данная смесь ферментных препаратов эффективна, однако не всегда. В некоторых случаях добавление пектиназы ингибирует выделение протопластов. Успешно применяется в этих целях целлюлозно-пектиновый препарат – *ксиланаза* (2,0-5,0%). Он включает *эндоксиладаназу, ксилозидазу, эндоглюкканазу, целлобиазу, эндополигалактуроназу, пектинэстеразу и протеазу*. Хорошую активность имеет и *целлокондин*, дополнительно содержащий фермент целлюлазного комплекса.

- Обработку листовой ткани раствором ферментов удобнее проводить в чашках Петри. После инкубации фрагменты листа осторожно перемешивают стерильным пинцетом, передвигая кусочки в одну сторону. Чашку Петри при этом держат под углом 15° . Энзиматическую смесь с протопластами переносят в центрифужные пробирки. Отделить протопласты от ферментативной смеси можно двумя способами: либо фильтрация с центрифугированием, либо флотация.

- При фильтрации смесь пропускают через нейлоновые фильтры с размерами пор 40-60 мкм. На фильтре при этом остаются агрегаты клеток и их большие осколки. При дальнейшем центрифугировании профильтрованной водной фазы при 100-400 об/мин в течение 3-5 мин оседают протопласты, а осколки клеток остаются в супернатанте. К осадку добавляют раствор регулятора осмотического давления. При повторном центрифугировании идет отмывка протопластов от фермента. Отмывают дважды. Отбирают раствор осмотика и добавляют несколько мл питательной среды (Мурасиге-Скуга). В камере Фукса-Розенталя определяют число протопластов в мл, исходную суспензию разводят средой так, чтобы конечное число клеток составляло $1-4 \times 10^4$ на 1 мл, и по 2 мл разливают в чашки и культивируют в темноте при 25 оС.

-

- Метод очистки фильтрацией очень эффективен. Но для ослабленных протопластов этап фильтрации часто бывает слишком груб.
- *Метод флотации* предложен **О. Гамборгом** с сотрудниками в **1981 г.** и предназначается для ослабленных хрупких протопластов. Он основан на том, что протопласты имеют более низкую плотность, чем органеллы или остатки клеточных стенок. К исходной неочищенной смеси добавляют раствор сахарозы или сорбита (концентрацией от 0,3 до 0,6 М) и центрифугируют при скорости от 40 – 80 до 350 g. Чистые протопласты плавают, осколки оседают на дно.

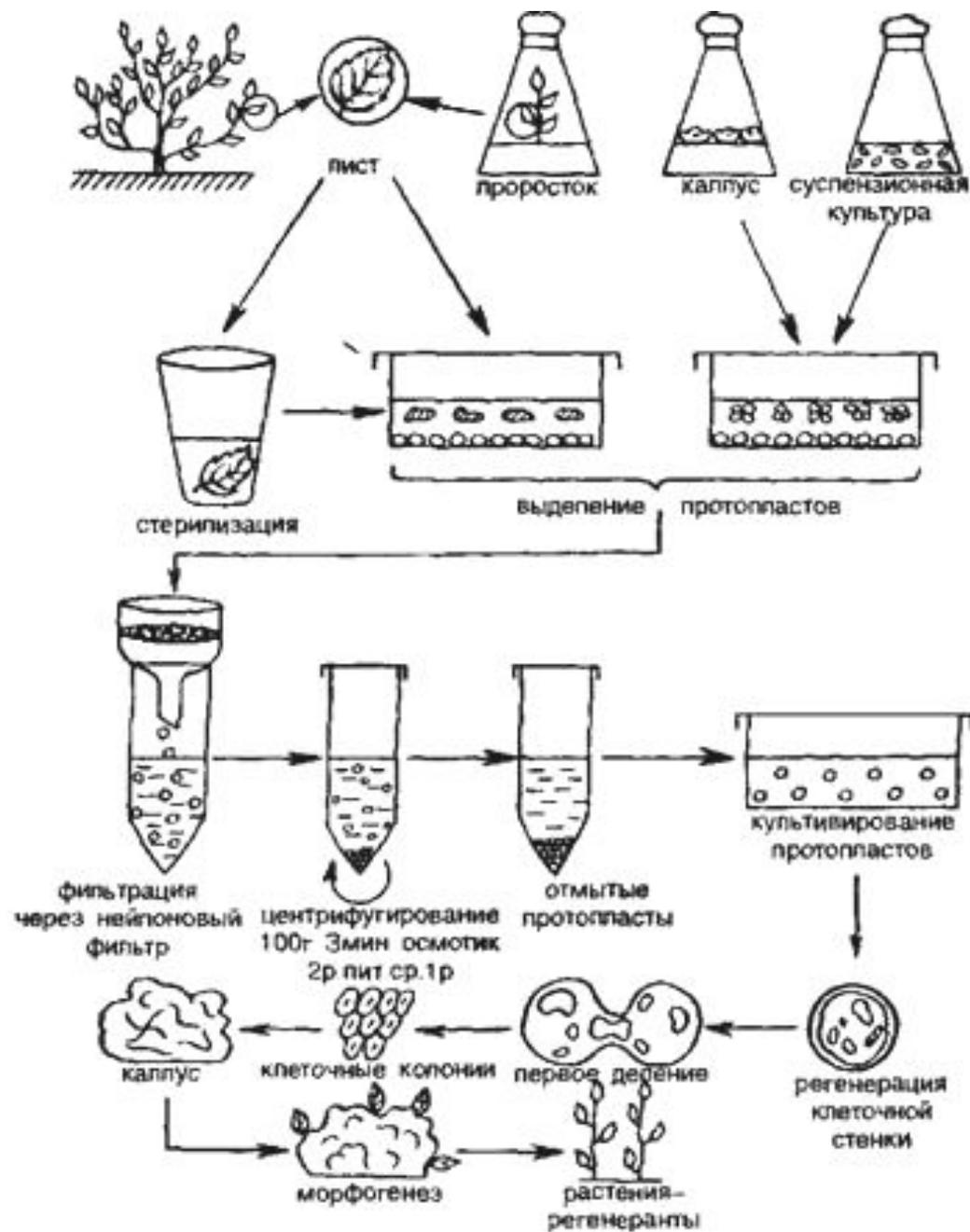
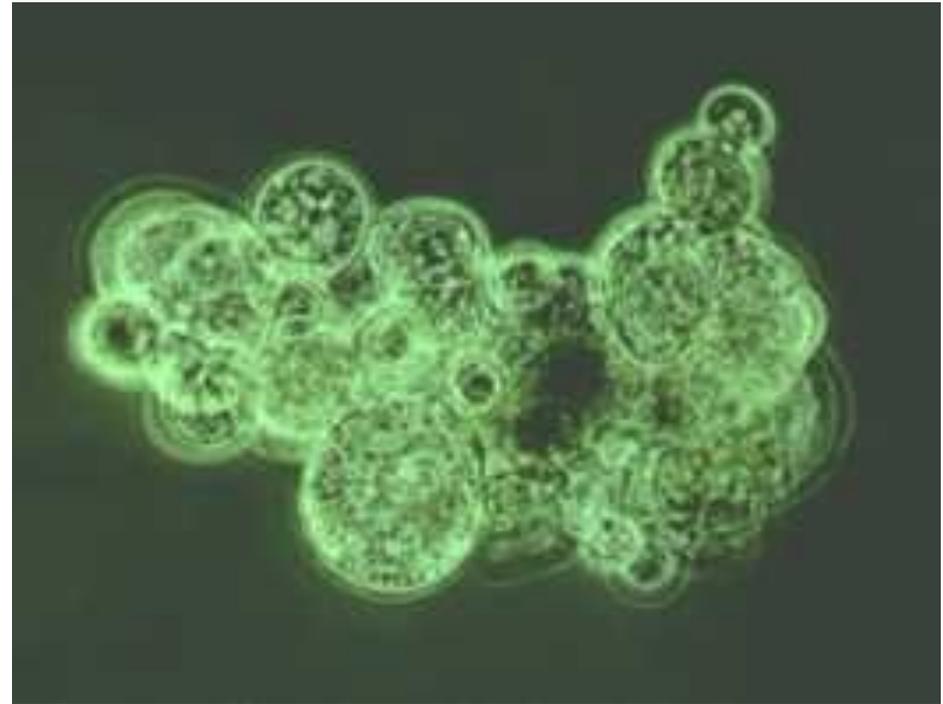
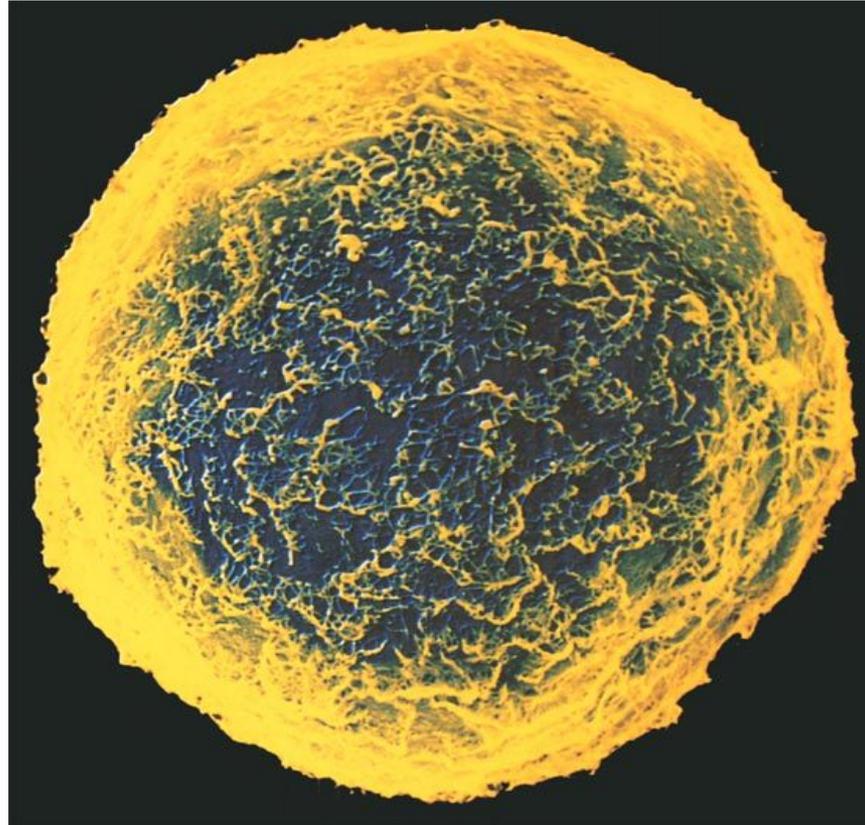


Рис. 1.16. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений

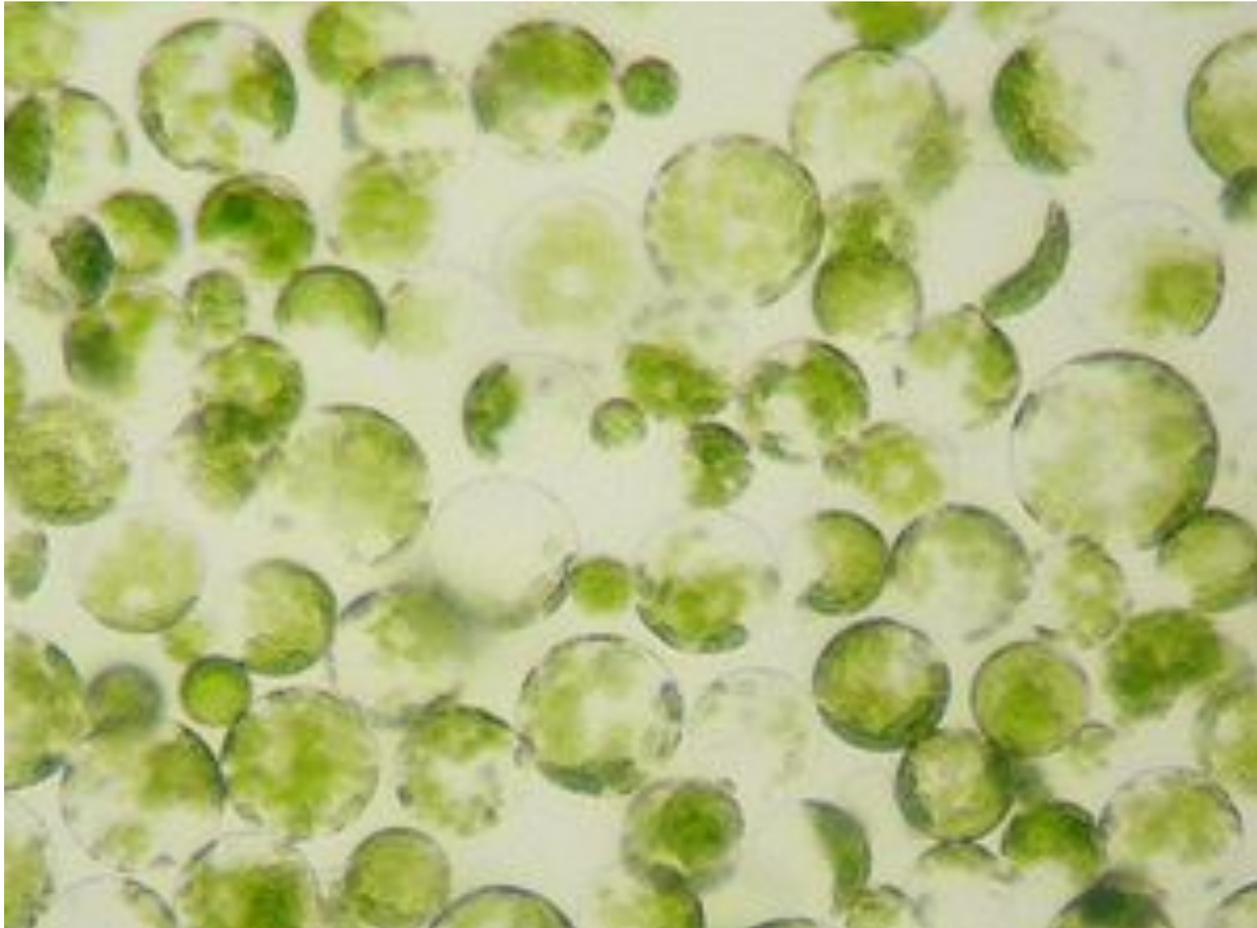
- Протопласты клеток табака



- Протопласт клетки мха



- **Протопласты клеток листа петунии**



- **Культивирование растительных протопластов**

- Для культивирования протопластов возможно использовать *метод жидких капель* (Као К. и др., 1971). В этом случае суспензия протопластов в виде капель в жидкой среде помещается в пластиковые чашки Петри. Метод обеспечивает хороший газообмен через воздушную фазу и диффузию в раствор экскретируемых продуктов. Кроме того, легко можно добавлять свежий раствор в нужной концентрации.
- Однако при культивировании этим способом протопласты агрегируются в центре каждой капли. Накапливаясь, они образуют значительное количество фенольных или других токсических соединений, что препятствует дальнейшему успешному культивированию. Этот метод также не удобен, если требуется исследовать развитие индивидуальной колонии протопластов.

- Удобным вариантом метода жидких капель является *культивирование в малом объеме* (до 1 мкл) единичных протопластов (микроизоляция) предложенное Ю. Глебой в 1978 г. В микрокаплях, даже если в них находится только одна клетка, соотношение объема клетки к объему питательной среды такое же, как в культуре плотностью около 1000 кл/мл.

- Другой широко распространенный метод – *агаровая культура* или *метод платирования* (Нагата Т., Такебе И., 1971). В этом случае определенный объем суспензии протопластов в жидкой питательной среде вносят в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же самой среды, содержащей 1% агар-агара. Температура не должна превышать 45 °С. Чашки заклеивают парафином и культивируют при температуре около 28 °С.
- Протопласты фиксированы в одном положении и физически отдалены один от другого. Этот метод имеет важное преимущество: можно наблюдать для одного конкретного протопласта все этапы его развития – формирование клеточной стенки, деление клеток, рост и развитие растения. Недостаток этого метода заключается в том, что возможно некоторое повреждение протопластов при смешивании с теплым агаром.

- Одним из вариантов данной методики является использование **«кормящих клеток»** или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или гамма-излучения (выбирается такая доза облучения, чтобы клетки утратили способность к клеточному делению, но поддерживали и стимулировали рост других клеток). Они смешиваются с жизнеспособными протопластами и платируются.
- Можно пласты «кормящих клеток» располагать в нижнем слое, а жизнеспособные протопласты – в верхнем. Этот метод позволяет культивировать суспензию протопластов более низкой концентрации, чем та, что обычно необходима для их роста.

- Сходным с этим методом является *метод совместных культур* (D. Evans, 1979). Метод используется для эффективного культивирования трудно культивируемых протопластов. Такие протопласты культивируются совместно с протопластами, отличающимися быстрым ростом. Успех такого культивирования основан на активных веществах, которые выделяются быстро растущими видами.

- По питательным потребностям изолированные протопласты сходны с целыми клетками. Поэтому питательные среды подобны таковым для клеточных культур. Наиболее часто используют среды Мурасиге-Скуга, модифицированную среду Нагата-Такебе, среду В5 Гамборга-Эвелейта, и среду 8Р Као-Мичайлук, представляющую собой обогащенную витаминами, аминокислотами и сахарами среду В5 Гамборга. Все эти среды содержат минеральные вещества, являющиеся источниками макро- и микроэлементов, источники углерода, стабилизаторы осмотического давления, витамины, фитогормоны.

- Температура культивирования является в значительной степени видоспецифичной и варьирует в достаточно широких пределах. При культивировании растительных протопластов температурный режим должен строго выдерживаться, т. к. обычно протопласты чувствительны даже к незначительным отклонениям от оптимальной температуры. То же касается и интенсивности освещенности. Оптимальные значения освещенности могут варьировать от абсолютной темноты до яркого света.
- Существенным фактором культивирования является плотность засева протопластов. При очень низкой плотности протопласты часто не делятся, в то время как при очень высокой плотности возникают затруднения на поздних этапах культивирования из-за появления в ростовой среде токсичных продуктов обмена. Оптимальная плотность протопластов в культуре составляет 10^3 - 10^5 кл/мл.

- Практически сразу после удаления раствора фермента может начинаться образование клеточной стенки. Для стимулирования образования клеточной стенки рекомендуется добавлять в среду сахара, входящие в состав клеточной стенки, а также ксилозу, рибозу и другие. Состав этих добавок может быть очень специфичным в зависимости от видовых особенностей протопластов.
- Для индукции деления протопластов многих видов растений эффективно добавлять в среду ауксины – 2,4-Д, НУК, а также цитокинины – кинетин, зеатин, бензиладенин.

- Труднее добиться регенерации растений. Регенерация растений осуществляется либо через эмбриогенез, либо через развитие каллуса с дальнейшей индукцией морфогенеза. Добиваются этого также добавлением в среду ауксинов или сочетания ауксинов с цитокининами.
- **Р. Г. Бутенко (1979—1981)** выделил следующие факторы, которые определяют пролиферативную способность клеток, возникших из изолированных протопластов:
 - 1. Видовая специфичность и физиологическое состояние исходной ткани растений.
 - 2. Способ и условия выделения протопластов.
 - 3. Плотность посева протопластов.
 - 4. Состав питательной среды, причем это относится не только к гормональным и витаминным добавкам, но и к концентрации минеральных солей и рН.

- Таким образом, используя разнообразные методы, учитывая характерные особенности исходного материала и соблюдая все условия, возможно успешное осуществление культивирования растительных протопластов, добиваясь в отдельных случаях получения целого растения из единичных протопластов. Впервые **Т. Нагата** и **И. Такебе** осуществили регенерацию целых растений табака из протопластов мезофилла листа (*Nicotiana tabacum*).
- Детальная разработка техники культивирования растительных клеток и получения и культивирования растительных протопластов послужила основой для создания методов биотехнологического конструирования растений с заданными свойствами.

• **Применение изолированных протопластов**

- Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных и прикладных физиологических проблем у растений.
- Изолированные протопласты имеют ряд областей применения:
 - 1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).
 - 2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.
 - 3. «Мягкое» выделение органелл.
 - 4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.
 - 5. Введение чужеродных органелл (клеточная инженерия).
 - 6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

