

**Влияние состава ферментного раствора на получение протопластов
подсолнечника (*Helianthus annuus*)**

Автор работы: Карпий Кристина, учащаяся 10 класса
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. Сеченова
РЦ “Медицинский Сеченовский Предуниверсарий”.

Научный руководитель: Гарибян Ц.С.– к.т.н., старший научный сотрудник
лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ

Москва, 2022

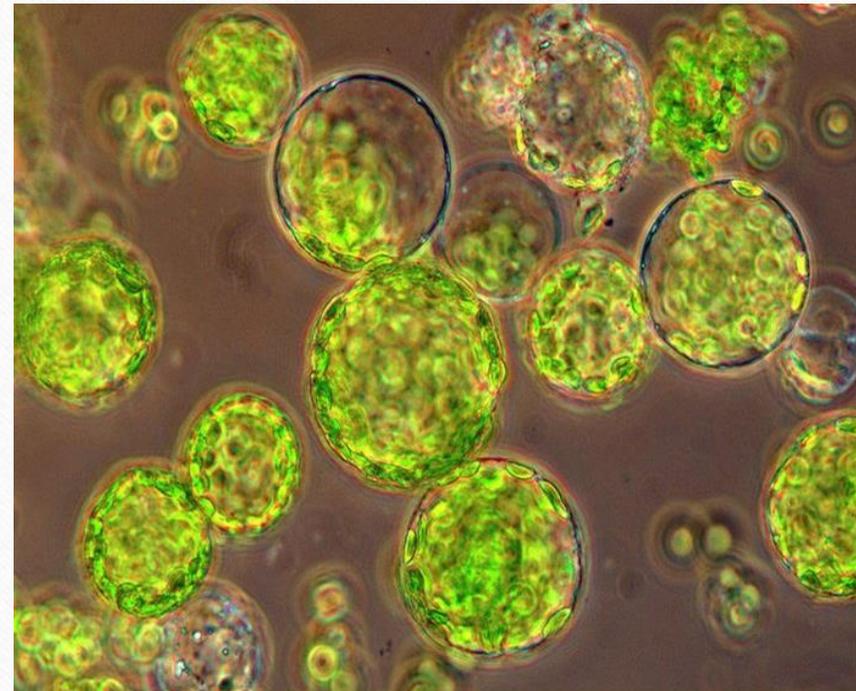
Актуальность



- В связи с ведущей ролью подсолнечника (*Heliánthus ánnuus*), как одним из важных масличных культур не только в России, но и во всем мире, актуальным становится изучение методов, увеличивающих получение и продуктивность данного растения.
- Основными резервами повышения урожайности этой культуры является дальнейшее совершенствование элементов технологии её возделывания, в том числе ускоренное внедрение в производство новых сортов и гибридов, рациональное внесение органических и минеральных удобрений (в питательные среды). Исследования, направленные на решение этих вопросов и были положены в основу работы.

Культура протопластов

- Протопласты - клетки лишённые целлюлозной оболочки.
- Растительные протопласты широко используются в качестве исходного материала для генетических манипуляций с культурными растениями.
- Выделение протопластов зависит от многих факторов, например от вида растения и сорта, от типа ткани, смеси ферментов, физиологического состояния растения, возраста растения и так далее.



Цель работы: изучить влияние состава ферментного раствора на получение протопластов подсолнечника.

- **Задачи:**

1. Изучить методику получения протопластов.
2. Выбрать сорта подсолнечника.
3. Приготовить и простерилизовать питательные среды.
4. Ввести семена в культуру *in vitro*.
5. Получить стерильные растения подсолнечника, отобрать молодые листья.
6. Приготовить ферментный раствор.
7. Выделить протопласты.
8. Проводить подсчет протопластов.
9. Сделать сравнительный анализ полученных результатов.

Выделение протопластов проводят в три этапа

1. Обработка ферментами,
2. Выделение протопластов из клеточных стенок,
3. Отделение интактных протопластов от клеточных осколков (схема 1).

Объектом исследований являлись растения подсолнечника (*Helianthus annuus*) сорта Казачий. Из семян подсолнечника сорта Казачий на питательных средах выращивали растения в условиях *in vitro* (рис.1).

схема 1

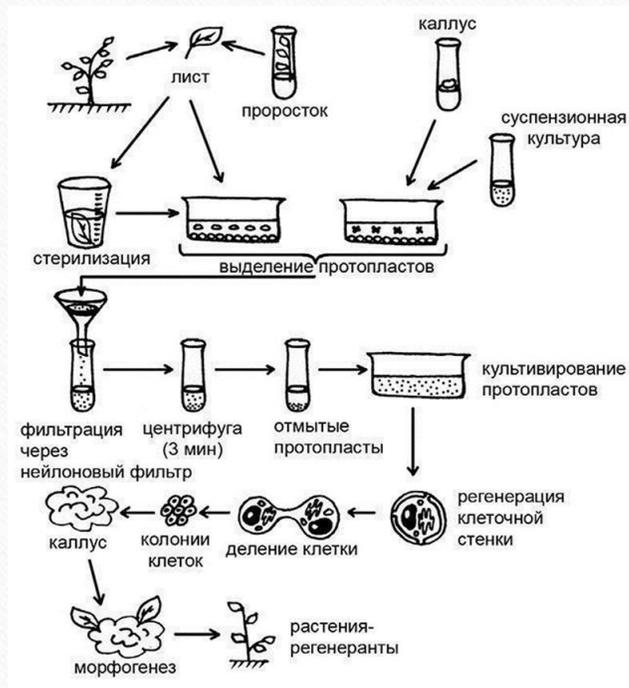


рис.1



Приготовление и стерилизация ферментного раствора

Получение протопластов

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 варьировали в вариантах опыта (рис.2).

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.

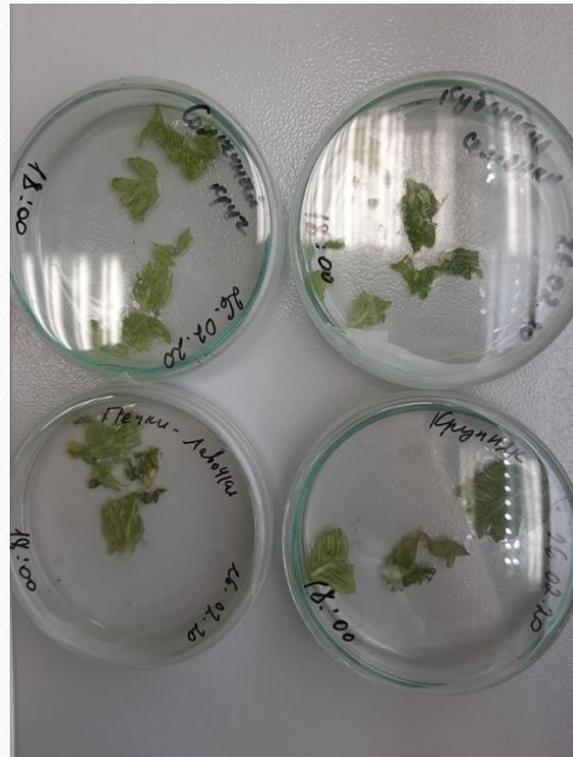


рис. 2 Листья подсолнечника в ферментных растворах, для выделения протопластов. На листьях специально сделали надрезы в виде елочки (для лучшего выделения).

Ферментный раствор готовили непосредственно перед опытом и простерилизовали в условиях ламинарного бокса с помощью бактериальных фильтров с размером пор 0.22 мкм (рис.3).

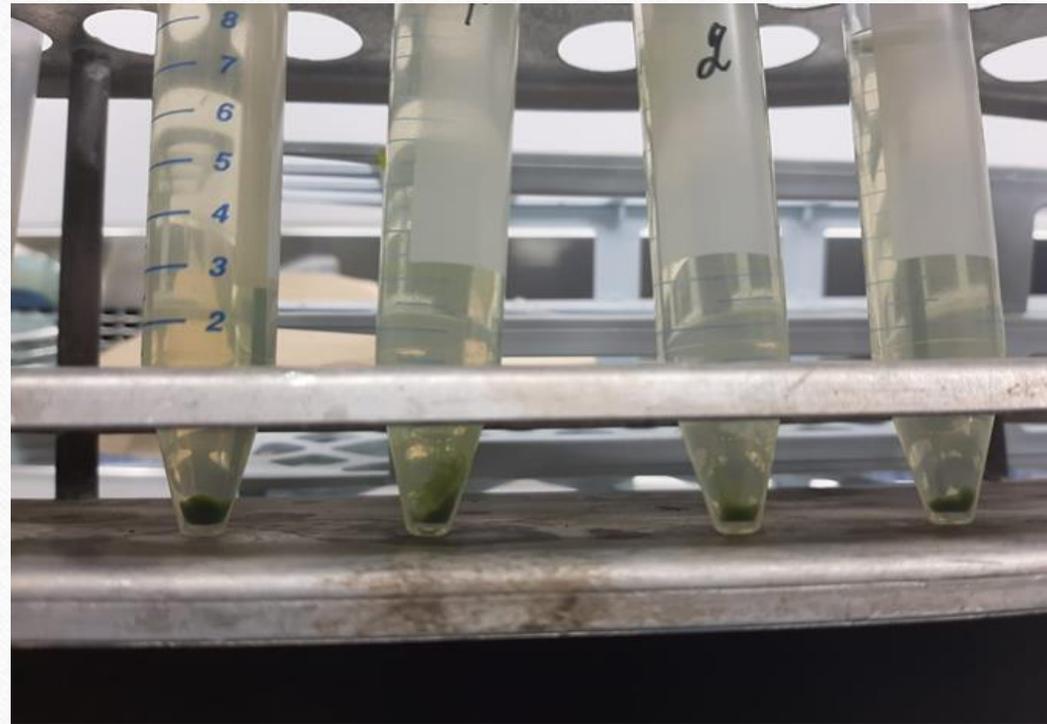
После инкубации выделенные протопласты очищали от ферментного раствора и от оставшихся непереваренных кусочков ткани фильтрацией и центрифугировали. После центрифугирования протопласты всплыли.

рис.3



Промывали протопласты последующим двукратным центрифугированием в промывочном растворе, каждый раз заменяя надосадочную жидкость свежей порцией раствора. После промывки протопласты осаждались (рис.4).

рис. 4 Осажденные протопласты подсолнечника в промывочном растворе W5.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оценивали эффективность выделения протопластов в зависимости от концентрации ферментов, подсчитывая количество выделенных протопластов с помощью камеры Горяева под микроскопом (рис.5).

Камера Горяева - приспособление, предназначенное для подсчета количества клеток в заданном объёме жидкости. Использовали её для подсчёта протопластов (рис.6). При помощи камеры Горяева возможно также определить увеличение и размер поля зрения оптического микроскопа.

Подсчет протопластов в камере Горяева осуществляется в пяти больших квадратах, что равно восьмидесяти малым. Для того чтобы избежать ошибки из-за неравномерного распределения протопластов в растворе, выбирают квадраты, расположенные по диагонали.

рис.5 Камера Горяева.



рис.6 Протопласты под микроскопом.

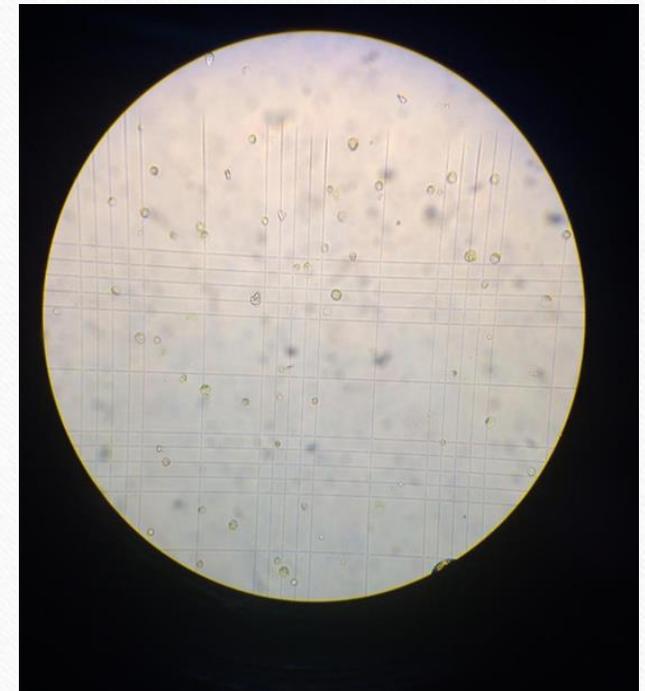


Таблица 1. Выход протопластов из листьев подсолнечника в зависимости от концентрации ферментов

Macerozyme,%	0,1	0,5	1
Cellulase,%			
0,1	-	250.000	300.000
0,5	150.000	800.000	250.000
1	400.000	460.000	90.000

ВЫВОДЫ

- ✓ Нами была исследована получение протопластов подсолнечника сорта Казачий из листовых эксплантов с использованием разной концентрации ферментов Cellulase 1,8U/mg (SERVA) и Macerozyme R-10 0,71 U/mg (SERVA) от 0,1% до 1% для каждого фермента.
- ✓ Полученные экспериментальные данные показали, что концентрация 0,5% Cellulase и 0,5% Macerozyme оказался наиболее эффективным для получения протопластов подсолнечника сорта Казачий.
- ✓ Выявлено, что увеличение концентрации ферментов свыше 0,5% , приводит к снижению выхода жизнеспособных протопластов.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

