

**ОЦЕНКА НАТИВНОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ И КЛЕТОК РАСТЕНИЙ****А.П. Кудряшов, М.П. Шапчиц***Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

На современном этапе развития биотехнологии препараты растительных клеток и протопластов широко используются для научных исследований и в биотехнологических процессах [1]. В протопласты можно относительно просто вводить не только чужеродную ДНК, но и компоненты большего размера – органеллы (например хлоропласты), что может существенно повысить продуктивность сельскохозяйственных культур [2].

Культуры клеток и тканей растений используют для получения природных соединений уже более 20 лет. Применение культур растительных клеток в промышленных масштабах сопряжено с рядом проблем, которые отчасти решаются при использовании препаратов иммобилизованных клеток (многократное использование клеток, более высокая плотность биомассы, повышение продукции и экскреции вторичных метаболитов и др. [3]).

Для решения указанных задач необходимо получать из растений препараты клеток и протопластов с неповрежденными органеллами, сохраненными функциями плазматической мембраны и процессами метаболизма. Поэтому в этих случаях актуальны как подбор реактивов и режимов обработки исходного растительного материала, так и оценка нативности получаемых протопластов и клеток в препаратах. В связи с этим в настоящей работе была поставлена цель провести анализ и подбор методов, позволяющих экспрессно определить нативность получаемых растительных протопластов и иммобилизованных клеток.

**Объекты и методы исследования.** Протопласты выделялись из молодых листьев растений шести видов: *Drimiopsis maculata*, *Begonia Feastii*, *Begonia Tiger*, *Setcreasea purpurea*, *Aloe juscunda* и *Nicotiana tabacum*. Подбор растений определялся цитологическими различиями, доступностью материала, способностью к регенерации и рядом других характеристик. Для выделения протопластов использовался водный раствор ферментного препарата, в состав которого входили пектиназа (0,5 ед/мг) и целлюлаза «Onozuka R-10» (1,8 ед/мг), концентрации указанных ферментов составляли 2% и 0,5% соответственно, хлорид кальция ( $10^{-3}$  М), манит (0,4 М). Значение кислотности ферментного препарата поддерживалось буферной смесью MES–Tris на уровне pH 5,6. Условия выделения протопластов подбирались путем варьирования температуры и времени экспозиции листовых фрагментов в ферментном препарате индивидуально для каждого из видов растений. С листовых пластинок *Drimiopsis* и *Setcreasea* снимался эпидермис и фрагменты листьев стороной, свободной от эпидермиса, помещался на поверхность жидкости, содержащей ферментный препарат в чашки Петри. С листьев *Begonia* эпидермис снимается плохо, а на поверхности листа *Nicotiana* он очень тонкий и не препятствует проникновению ферментов к клеткам мезофилла листа, поэтому фрагменты интактных листьев указанные растений помещались чашки Петри. Из листьев же *Aloe* полностью удалялся эпидермис вместе с прилежащим к нему фотосинтезирующим мезофиллом, и оставались только внутренние водозапасающие ткани.

После экспонирования листьев в растворе с ферментами остатки неразрушенных тканей удалялись, а протопласты осаждались в течение 15–20 мин. При работе с протопластами, выделяемых из листьев *Begonia*, для осаждения применялось центрифугирование (10 мин при 500 g). Протопласты *Begonia* оказались устойчивыми к такого рода воздействиям, в то время как протопласты из других растений характеризовались высокой степенью их повреждения после центрифугирования. Осаждение протопластов из других видов растений проводилось естественным путем в

течение довольно продолжительного времени. Осажденные протопласты несколько раз промывались средой (Ср. 2), имеющей значение pH 7,8 и не содержащей как ферментов, так и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (слабощелочная реакция среды без  $\text{Ca}^{2+}$  позволяет инактивировать остатки ферментов). В то же время в состав Ср. 2 входило  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ . В конечном итоге протопласты переносились в среду (Ср. 3), содержащую  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{KCl}$ ,  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{NaCl}$  и 0,5 М маннита, при pH 7,8, которая позволяла поддерживать жизнеспособность протопластов на время исследований.

Препараты иммобилизованных растительных клеток получали из суспензионных культур *Nicotiana tabacum* и *Syringa vulgaris*. Для иммобилизации клеток суспензионных культур *Nicotiana tabacum* и *Syringa vulgaris* применялся метод их включения в гель альгината кальция. Этот метод прост, гель обладает достаточной механической прочностью в то же время отмечается высокая степень удерживания клеток в полисахаридном матриксе, а условия включения их в гель «мягкие», в результате чего последние сохраняют жизнеспособность. Для иммобилизации в альгинатном геле осажденные суспензионные культуры табака и сирени ресуспендировали в растворе сахарозы (20 г/л) для предотвращения плазмолиза клеток или в ростовой среде, используемой для поддержания роста данных культур. Суспензию клеток смешивали с 2-3% раствором альгината натрия в пропорции 1: 1, после чего полученную смесь с помощью шприца по каплям добавляли в охлажденный 0,25 М раствор хлорида кальция. При этом формировались сферические гранулы диаметром 4-5 мм. Полученные гранулы выдерживали 20 мин для стабилизации при 4 °С и затем промывали дистиллированной водой.

Для окрашивания нейтральным красным (НК) к суспензии протопластов, находящихся в Ср. 3, добавлялось несколько капель 2 % спиртового раствора красителя. В растворе НК протопласты выдерживались 10–15 мин. Окрашивание клеток каллусных и суспензионных культур и препаратов иммобилизованных клеток осуществлялось при pH 8,5-9 и выше (величину pH регулировали с помощью 0,1 %-ного раствора КОН) в течение 20-30 мин. Окрашивание протопластов диацетатом флюоресцеина (ДФ) производилось путем их 15 мин инкубации в  $3 \cdot 10^{-3}$  М растворе красителя и последующего многократного отмывания. Интенсивность флюоресценции суспензии протопластов измерялась при помощи флюоресцентного спектрофотометра *Cary Eclipse varian* при возбуждении светом с длиной волны 490 нм.

Подсчет количества протопластов и клеток в суспензии производился при помощи камеры Горяева. При определении количества иммобилизованных клеток производилось определение среднего их содержания в давленных препаратах (гранулах) в поле зрения микроскопа. Для достижения надежности и воспроизводимости результатов, а так же возможности дальнейшего культивирования полученных протопластов, все манипуляции проводились со стерильными средами в асептических условиях в ламинар-боксе. Основы среды стерилизовались автоклавированием, а ферментный препарат асептизировался фильтрацией через стерильные мембранные фильтры с диаметром пор 0,25 мкм.

**Результаты и обсуждение.** Самую достоверную оценку нативности растительных клеток и протопластов дает изучение их способности к регенерации клеточной стенки, делению и последующему органогенезу. Однако эти методы трудоемки, а на постановку подобного рода исследований уходит много времени. Предлагается ряд экспресс-методов, которые позволяют с достаточно высокой достоверностью подсчитать процент жизнеспособных протопластов и клеток в суспензии. Эти методы основываются главным образом на регистрации метаболической активности, а также целостности и нативности плазматической мембраны клеток и протопластов. В наших исследованиях препараты клеток и протопластов тестировались на сохранение жизнеспособности путем окраски их витальными красителями (НК и ДФ), а также по результатам наблюдения за набуханием их в гипотонических средах (тест на сохранение осмотических свойств).

По литературным сведениям достаточно часто для выявления сохранения биохимических процессов предлагается использовать различного рода витальные красители, которые изменяют свои оптические свойства в результате химических модификаций их структуры, происходящих с участием ферментов, например диацетат флюоресцеина. Это нефлюоресцирующее соединение, которое легко проникает через биомембраны, и, попадая в клетку, расщепляется неспецифическими эстеразами, до высвобождения флюоресцеина. Флюоресцеин плохо проникает через биомембраны, что способствует его аккумуляции в живой клетке. Обнаружить же флюоресцеин можно по характерной для него флюоресценции. Метод оценки жизнеспособности растительных клеток по их окраске диацетатом флюоресцеина является достаточно популярным среди исследователей [4]. Однако его применимость для экспрессной оценки жизнеспособности растительных протопластов сомнительна, поскольку в этом случае требуется тщательная отмывка протопластов от ферментного препарата и обломков разрушенных клеток. Эстеразы могут присутствовать как в ферментных препаратах в виде примесей, так и в среде (выделяются в среду из разрушенных клеток). Действительно нами обнаружено достаточно сильная флюоресценция среды, в которой суспендировались протопласты из водозапасающей ткани *Aloe jucunda* (клетки этой ткани практически лишены хлоропластов). Причем, это свечение было заметным даже после трехкратного отмыва протопластов. Так у среды с удаленными протопластами интенсивность флюоресценции составляла почти 27% от исходной характерной для суспензии протопластов. По нашему мнению такое явление связано с высвобождением эстераз при разрушении протопластов, во время процедур их выделения и отмыва. Кроме того, для оценки нативности протопластов указанным методом требуется дополнительное оборудование (флуоресцентный спектрофотометр или флуоресцентный микроскоп) или другие приспособления для подобного рода исследований. Причем прямое визуальное (под микроскопом) наблюдение флюоресценции у клеток, содержащих антоцианы или хлоропласты затруднено.

Следующая группа методов экспрессной оценки растительных протопластов и клеток базируется на проверке сохранения функций их плазматической мембраны. Обычно в этих процедурах оценивается сохранение барьерно-транспортных свойств плазмалеммы. Липидный бислой плазматической мембраны слабо проницаем по отношению к полярным молекулам и относительно хорошо пропускает молекулы воды и неполярных соединений. В связи с возможностью легкого проникновения воды через мембрану для интактных клеток и протопластов должны быть характерны осмотические явления.

Кроме этого способа оценить сохранение функций плазмалеммы и тонопласта можно с помощью витального красителя нейтрального красного. Кислотно-основной индикатор нейтральный красный характеризуется тем, что изменение его цвета (от интенсивно красного до бледно желтого) происходит при сдвиге рН в пределах значений от 6,8 до 8,0, что соответствует закономерностям ионизации его молекул. Неионизированные молекулы нейтрального красного, которые преобладают в слабо щелочных растворах, характеризующихся бледно желтой окраской, легко проникают через биологические мембраны. Трансмембранный же перенос ионизированных форм нейтрального красного, которые преобладают в кислых средах, затруднен. Таким образом, скорость поступления через мембрану в клетку молекул НК из среды, должны зависеть от рН последней. Кроме того, при достижении равновесия, т. е. когда потоки вещества, направленные внутрь клетки и из неё в среду уравниваются, возможна такая ситуация, что будет отмечаться неравенство концентраций красителя в среде и в компартменте, окруженном мембраной (протопласте или клетке). Если предположить, что через мембрану проникают только электрически нейтральные молекулы слабого основания, то нетрудно показать, что ионизированный  $([R^+])_i$  нейтральный красный должен распределяться в системе клетка–среда в зависимости от соотношения величин их рН:

$$[\text{R}^+]_{\text{к}} / [\text{R}^+]_{\text{с}} = [\text{H}^+]_{\text{к}} / [\text{H}^+]_{\text{с}} \equiv 10^{(\text{pH}_{\text{с}} - \text{pH}_{\text{к}})}$$

где квадратный скобки отражают молярные концентрации ионизированных форм нейтрального красного ( $\text{R}^+$ ) и ионов водорода, а подстрочный индекс относится к клетке или среде.

Разумеется, в реальной ситуации через мембрану способны диффундировать и ионизированные формы нейтрального красного, поэтому невозможно достичь, например, 100 кратного градиента концентраций слабого основания при различиях в величинах pH на 2 ед, однако и при наблюдаемом различии коэффициентов проницаемости мембраны для ионизированных и неионизированных форм слабого основания должна отмечаться заметная аккумуляция последнего в «кислом компартменте» клетки, например, в вакуоли.

Метаболизирующие клетки растений характеризуются наличием градиента pH между вакуолью и цитоплазмой. Содержимое вакуоли имеет кислую реакцию (pH 5,5 или ниже). В связи с этим в жизнеспособных клетках растений, помещенных в слабощелочной раствор нейтрального красного, последний должен аккумулироваться в вакуолях, что проявляется в интенсивной окраске клеток в малиново-красный цвет. Таким образом, при окрашивании растительных клеток и протопластов нейтральным красным тестируется не только сохранение функций мембран, но и нативное распределение кислотности, характерное для живой клетки.

Таблица - Характеристики протопластов, получаемых из листьев растений при различных условиях инкубации в среде ФР

Вид	Условия инкубации в среде ФР		Выход протопластов, количество протопластов с 1 см <sup>2</sup> поверхности листа	Относительное количество жизнеспособных протопластов, %	
				метод определения нативности	
	Температура, °С	Время, ч		НК	Осмотический
<i>Drimiopsis maculata</i>	24	4	11847±1520	80,0±6,0	85,0±4,2
	6	24	35416±10000	79,4±12,0	77,6±6,4
	6	48	44148±1455	32,6±11,9	30,0±5,9
<i>Begonia Feastii</i> и <i>Begonia Tiger</i>	24	4	-	-	-
	6	24	30178±5406	-*	73,4±10,8
	6	48	101050±20210	-*	70±6,5
<i>Setcreasea purpurea</i>	24	4	29524±2920	75,5±10,0	47,2±10,1
	6	24	66369±4029	55,4±3,3	20,4±7,3
	6	48	0	0	0
<i>Aloe jucunda</i>	24	4	-**	75,5±4,0	78±4,0
	6	24	-**	73,8±5,5	75±6,0
<i>Nicotiana tabacum</i>	24	4	единичные	-	-
	24	12	10560±500	73±5,7	70±3,5
	6	24	1360±359	65±6,5	60±7,3

\* – не определялось из-за наличия окрашенных антоцианами протопластов

\*\*– данные не приведены, т. к. протопласты выделялись не с поверхности листовой пластинки, а из внутренних водозапасающих тканей

Оценка нативности протопластов, получаемых из листьев различных растений при варьировании временных и температурных режимов, по их набуханию и способности окрашиваться нейтральным красным в целом дали практически одинаковые результаты (табл.). Однако, более половины протопластов выделяемых при суточной экспозиции из

листовых фрагментов *Setcreasea* окрашивалось нейтральным красным, в то время как в гипотонической среде набухало лишь 20,4% протопластов. Вероятно, нативность плазмалеммы более точно отражают данные, полученные на основе оценки ее осмотических свойств. Некоторые протопласты из листьев *Begonia* окрашены в красный цвет содержащимися в них антоцианами, в связи с этим оценка их нативности производилась лишь по набуханию в гипотонической среде.

Не менее важно экспрессно получать сведения и о состоянии иммобилизованных клеток. Ведь во время процедур иммобилизации они подвергаются ряду повреждающих факторов [4]. Не исключено, что в результате такого рода воздействия часть клеток может быть повреждена настолько, что утратят способность к регенерации. Использование явлений плазмолиза и деплазмолиза для оценки нативности растительных иммобилизованных клеток затруднено, поскольку носитель (в нашем случае гель альгината кальция) обладает ограниченной прозрачностью. В этом случае наблюдении осмотических явлений возможно лишь для клеток находящихся у поверхности гранул. Основная же масса клеток при значительном увеличении микроскопа плохо различима. По указанной причине для оценки нативности клеток включенных в альгинатный гель использовалось их окрашивание нейтральным красным в слабо щелочных растворах. В этом случае живые клетки интенсивно окрашивались в малиново-красный цвет, а материал носителя оставался неокрашенным (рис. 1). Именно эта ситуация позволяла без особого труда производить подсчет метаболизирующих клеток, включенных в альгинатный гель: хотя альгинат кальция заметно рассеивает свет, однако в нем при небольшом увеличении (50–100 х) можно различить (подобно сигналу светофора в тумане) и подсчитать яркие красные пятна, соответствующие положению клеток включенных в гель. (рис. 1).

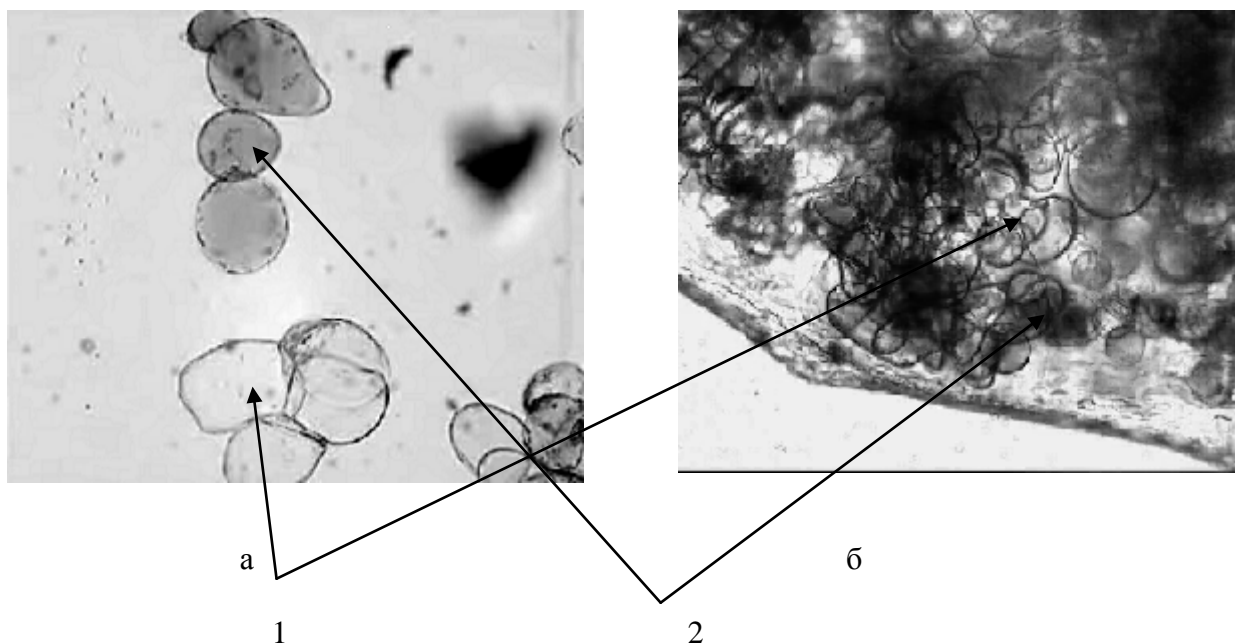


Рисунок 1 - Микрофотоснимки препаратов суспензионной культуры *Syringa vulgaris* (а) и иммобилизованных в альгинате кальция клеток *Nicotiana tabacum* (б), окрашенных нейтральным красным. Видны клетки неокрашенные (1) и аккумулирующие НК (2).

Следует отметить исключительное удобство указанного способа оценки нативности клеток включенных в гранулы альгинатного геля. При небольшом увеличении гранула почти полностью находится в поле зрения микроскопа, в то же время в ней отчетливо различаются окрашенные НК живые клетки, а на периферии возможно наблюдение и

материала, утратившего интактность. Опытный исследователь по степени окраски гранул препарата может оценить относительное его качество. Разумеется, для более детальной оценки необходимо провести разрушение гранул и высвобождение из иммобилизованного состояния. Причем, проведение, этой процедуры вполне возможно после окрашивания иммобилизованных клеток. Разрушение гранул альгината кальция можно осуществить как механически, так и химически. В последнем случае используются буферные растворы сдвигающие рН среды (например фосфатный буфер). Подобная процедура позволяет выделить клетки из гранул геля, причем при их высвобождении не отмечается потеря окраски.

**Выводы.** Анализируя применимость различных методов оценки нативности протопластов, следует отметить, что наиболее пригодным в использовании оказался метод деплазмоллиза. Он достаточно точно (из используемых) демонстрирует сохранение барьерно–транспортной функции плазмалеммы. Метод окраски нейтральным красным более нагляден, удобен и во многих случаях дает вполне согласующиеся с полученными по набуханию протопластов оценками результаты анализа, однако при наличии в клетках антоцианов проведение достоверной оценки жизнеспособности протопластов затруднено. Кроме того, в отдельных случаях (протопластов из *Setcreasea*) результаты оценки нативности этим методом не совпадали с таковыми на основании способности протопластов набухать в гипотонических средах.

В то же время метод окраски нейтральным красным позволяет без труда выявить и подсчитать количество нативных растительных клеток в суспензии или включенных в альгинатный гель. Кроме того, метод окраски нейтральным красным относительно прост и позволяет более детально определить нативность препарата: оценить не только сохранение функций плазмалеммы, но и наличие градиента рН между вакуолью и цитоплазмой. При проведении экспересс оценки нативности растительных клеток и протопластов в каждом конкретном случае необходим индивидуальный подход.

Оценка нативности протопластов с помощью диацетата флюоресцеина затруднена из-за обязательного наличия в среде с суспендированными протопластами эстераз, катализирующих образование флюоресцеина. Непосредственное же наблюдение флюоресценции отдельных клеток требует специального оборудования.

#### Список литературы

1. Джардемалиев Ж. К. Деление протопластов, выделенных из клеточной суспензионной культуры пшеницы *Triticum aestivum* (L)/ Джардемалиев Ж. К., Карабаев М. К., Мухаметкалиев М. Т., Бутенко Р. Г. // Физиол. растений. 1992. т. 39. вып. 1. С. 135–142
2. Бекер М. Е. Биотехнология / Бекер М. Е., Клиепиньш Г. К., Райпулис Е. П.. – М. 1990. 451 с,
3. Akimoto C. / Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells / Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. P. 429-436.
4. Бодей С.П. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Бодей С.П., Кабрал И.М., Кафлэн М.П. и др. – М.: Мир, 1988.- 452 с..