

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕКТИНАЗ БАКТЕРИЙ *ERWINIA* ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ И КЛЕТОК ИЗ ЛИСТЬЕВ ТАБАКА

Традиционным способом получения протопластов у растений является обработка ткани (листа, стебля, корня, клубня) комплексом мацерирующих ферментов, в состав которого входят пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы [1]. В силу существенных различий в составе клеточных стенок растений различных видов [1] в каждом конкретном случае необходимо варьировать состав среды, условия получения, соотношение отдельных ферментов в мацерирующей смеси.

Образование комплекса пектолитических ферментов характерно для бактерий рода *Erwinia*, являющихся патогенами ряда растений и вызывающих «мягкие гнили» клубней, стеблей и т. д. [2]. В настоящей работе исследовалась возможность получения протопластов и клеток из листьев растений табака при совместном действии пектолитических ферментов бактерий *Erwinia atrosepatica* и *Erwinia chrysanthemi* и препарата целлюлаза целловиридина ГЗх.

### Материал и методика

В работе использовали мацеразу А и мацеразу С (производства НПК «Биотех»), высокоочищенные пектолитические ферментные препараты, полученные из бактерий *Erwinia atrosepatica* и *Erwinia chrysanthemi* соответственно, а также целловиридин ГЗх (производства Приволжского БХЗ), содержащий комплекс целлюлолитических ферментов.

Листья 3–5-недельных растений табака стерилизовали спиртом, промывали в стерильной дистиллированной воде и освобождали от нижнего эпидермиса. После этого переносили в мацерирующую смесь следующего состава (мг/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 27,2;  $\text{KNO}_3$  – 101,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 246,0;  $\text{KJ}$  – 0,16;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,025;  $\text{CaCl}_2$  – 1480,0; сахароза – 210000 (рН 5,6–5,8), в которую вносили мацеразу А и мацеразу С и целловиридин в различной концентрации. Листья инкубировали в темноте при 20–28 °С от 3 до 6 ч. Количество протопластов подсчитывали в микроскопе «Биолам» с использованием камеры Горяева, а их жизнеспособность определяли при окрашивании метиленовым синим (0,01 %) [3].

При получении клеток из листьев табака обработке мацерирующей смесью предшествовала обработка 0,025М натрий-ацетатным буфером в течение 30 мин (рН 4,5–5,2).

### Результаты и их обсуждение

Необходимыми условиями получения протопластов из листьев растений являются освобождение листовой ткани от нижнего эпидермиса, а также совместная обработка ее пектиназами и целлюлазами, разрушающими пектиновые вещества и целлюлозные компоненты клеточных стенок. Комплексные препараты пектолитических ферментов были получены после соответствующего концентрирования и очистки из культуральной жидкости бактерий *Erwinia atrosepatica* и *Erwinia chrysanthemi*. Было установлено, что они обладают пектатлиазной и полигалактуроназной активностями в соотношении 10:1 (мацераза А) и пектатлиазной и пектинметилэстеразной активностями в соотношении 10:1 (мацераза С). Ферменты, обладающие таким набором активностей, способны расщеплять гликозидные связи в 1,4- $\alpha$ -Д-галактуронанах, а также вызывать у них дезацетиляцию метильных групп [4], вследствие чего их можно использовать для разрушения пектиновых веществ клеточной стенки. Отечественной промышленностью выпускается препарат целловиридин ГЗх, обладающий спектром различных целлюлолитических активностей, способный разрушать целлюлозные микрофибриллы и обычно используемый для обработки грубых кормов с целью повышения их усвояемости. Представляется очевидным, что сочетание этих ферментов должно

приводить к мацерации растительной ткани и высвобождению протопластов или клеток.

Действительно, экспериментально были подобраны соотношения и концентрации ферментов в мацерирующей смеси, оптимальные для выделения жизнеспособных протопластов: мацераза А или мацераза С – 1,5 Е/мл (по пектаттиазе); целловиридин – 0,5 %. Повышение концентрации ферментов приводило к потере жизнеспособности (с 81 % до 20 – 25 %), быстрому разрушению протопластов, неравномерному распределению хлоропластов в цитоплазме. При использовании более низких концентраций ферментов значительно увеличивалось время обработки, что, по мнению некоторых авторов [5], отрицательно сказывается на свойствах получаемых протопластов: их жизнеспособности, способности к регенерации и т. д.

Весьма существенным для выделения нативных протопластов является выбор осмотического стабилизатора. Обычно ими служат растворы сахаров (сахарозы, глюкозы, сорбита) в концентрации 15 – 21 %.

Т а б л и ц а 1

Эффективность образования протопластов из листьев табака в зависимости от осмотического стабилизатора и времени обработки

Тип и концентрация мацеразы и целлюлазы	Осмотический стабилизатор	Количество протопластов ( $\times 10^6$ ) при инкубировании в течение:		
		3 ч	6 ч	16 ч
А(1,5 Е/мл), целловиридин ГЗх (0,5 %)	сахароза	1,2	1,9(83)	2,1(81)
	сорбит	0,3	1,8(81)	2,6(62)
	глюкоза	0,4	1,4(83)	1,7(74)
С(1,5 Е/мл), целловиридин ГЗх (0,5 %)	сахароза	1,0	2,0(78)	2,9(78)
	сорбит	0,4	1,5(62)	1,8(78)
	глюкоза	0,6	1,8(80)	2,2(80)

Примечания: количество протопластов рассчитывали на 1 г сырой ткани; в скобках указано количество жизнеспособных протопластов в процентах от общего числа.

Результаты изучения влияния различных сахаров на выход протопластов приведены в табл. 1. Из них следует, что использование сахарозы является наиболее оптимальным и дает стабильные результаты при обработке в течение 3 – 6 ч. При этом за 6 ч происходит достаточно полная мацерация ткани и увеличение времени инкубирования незначительно влияет на выход протопластов. Менее удобным стабилизатором является глюкоза, так как в любом из приведенных вариантов получаемое количество протопластов ниже, хотя их жизнеспособность достаточно высока. Вероятно, в некоторых случаях возможно использование и сорбита: выход протопластов практически такой же, как и с сахарозой, однако жизнеспособность их ниже.

Таким образом, из представленных результатов следует, что ферментные препараты пектолитического действия мацераза А и мацераза С могут быть использованы для получения протопластов табака в сочетании с целловиридином ГЗх.

С помощью указанных ферментных препаратов возможно выделение не только протопластов, но и клеток. Такое предположение основано на результатах работы [5], в которой показано, что при определенном значении рН меняется соотношение активностей различных ферментов, существенных для протекания процесса разрушения клеточной стенки. Кроме того, предобработка листовой ткани при низких значениях рН приводит к изменению в структуре клеточных оболочек, в результате чего наблюдается предпочтительное образование клеток, а не протопластов (при действии одних и тех же ферментов).

Нами исследовалась возможность выделения клеток табака при условии обработки ткани в натрий-ацетатном буфере с последующей ее мацерацией в растворе мацераз и целловиридина ГЗх. Для проведения таких экспериментов листовую ткань помещали в 0,025М буфер с различными значениями рН на 30 мин. После этого дважды промывали в 0,025М *трис*-НСl буфере (рН 7,7) и помещали в ферментный раствор для получения протопластов. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Эффективность образования клеток табака при различных условиях предобработки ткани натрий-ацетатным буфером

рН буфера	Количество клеток ( $\times 10^7$ ) при обработке целловиридином и	
	мацеразой А	мацеразой С
4,5	1,6	2,8
4,7	4,0	3,6
4,9	1,8	2,3
5,1	1,0	1,0
5,2	0,2	0,4

Как видно, оптимальной является обработка в буферах с рН 4,5 – 4,7; повышение рН отрицательно сказывается на количестве образующихся клеток. Отмечено, что наиболее полному и эффективному освобождению клеток способствует освещение: в темноте выделения клеток из ткани табака не наблюдалось, а при освещенности  $2 \cdot 10^3$  лк были получены положительные результаты, т. е. обработку мацерирующей смесью следует проводить на свету. В этом случае через 16 ч происходило выделение из ткани листа типичных для мезофилла табака клеток.

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о том, что ферментные препараты мацераса А и мацераса С могут быть успешно использованы для получения клеток и протопластов из листьев табака: в течение короткого времени (3 – 6 ч) наблюдается выделение значительного их количества при сохранении высокой жизнеспособности, т. е. указанные ферменты могут эффективно заменить импортные препараты типа Онозука Р-100, мацерозим и др.

### Список литературы

1. Гусев М. В., Киркин А. Ф., Корженевская Т. Г., Маркарова Е. Н. Клеточная инженерия. М., 1987.
2. Regombelot M. C. M., Kelman A. // Ann. Rev. Phytopath. 1980. V. 18. P. 361.
3. Бутенко Р. Г., Кучко А. А., Витенко А. К., Аветисов В. А. // Физиол. растений. 1977. Т. 24. № 3. С. 660.
4. Родионова Н. А. // Ферменты, катализирующие расщепление полисахаридов клеточной стенки высших растений: Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. 1989. Т. 19. Ч. 1.
5. Гайворонская Л. М., Хасирджеева А. К., Бутенко Р. Г. // Физиол. растений. 1982. Т. 29. № 4. С. 794.