

2. *Строение* некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совы, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // Там же.— 1986.— 2, № 1.— С. 30—35.
3. *Three-dimensional structure of catalase from Penicillium citale at 2.0 Å resolution* / В. К. Vainshtein, W. R. Melik-Adamyam, V. V. Barynin et al. // J. Mol. Biol.— 1986.— 188, N 1.— P. 49—61.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 24.03.87

УДК 581.1.085

## ПРОСТОЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ ИЗ ФОРМ МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОЧЕК РИСА

Хунг Суан Тхао, Чинь Ман Зунг, Нго Кэ Сьонг

С 1975 года получение гаплоидного риса стало шаблонным [1]. Гаплоидные растения в течение длительного времени могут сохраняться и размножаться в форме множественных почек. Природа множественных почек была объяснена впервые так называемым «эффектом многопобеговости» [2—4]. С тех пор был предпринят ряд серьезных усилий, направленных на изучение такой важной группы растений, как хлебные злаки, включая рис [5]. Тем не менее проблема все еще не решена, так как получить культуру протопластов непосредственно из растений риса очень трудно. Единственным источником протопластов у риса был каллус. Последующая регенерация растений из культуры протопластов показала, что этот путь не является осуществимым, поскольку тотипотентность каллусов, особенно пыльцевых, из которых выделяли протопласты, часто была утрачена [6]. Стремясь найти решение, мы использовали в качестве исходного материала множественные почки. Протопласты, изолированные непосредственно из проростков, являются более однородными, и из них легче осуществить регенерацию растений.

Проростки риса были получены при возделывании гаплоидных множественных почек на среде МС [7], дополненной 15% (по объему) кокосового молока, 1 г/л иптона (соевый ферментативный пептон), 15 мг/л тиаминхлорида, 0,2 мг/л нафтилуксусной кислоты и 0,3 М сахарозой. Величину рН устанавливали на уровне 5,8 с помощью 0,1 н. NaOH. Культуру содержали при 28°C и освещали флуоресцентными лампами в 2000 лк с чередованием 8 ч света и 16 ч темноты. Протопласты выделяли из молодых листьев одномесячных проростков, выращенных в стерильных условиях в колбах Эрленмейера объемом 0,5 л, содержащих 150 мл питательной среды. Одним из факторов, эффективно влияющих на рост проростков и массу листьев, пригодных для изоляции протопластов, являлась концентрация сахарозы (табл. 1).

В течение первой недели при нормальной концентрации сахарозы (0,1 М) наблюдался лучший результат, но наибольшего размера проростки достигали через 4 недели на среде с 0,3 М сахарозой. На этой же среде была получена и наибольшая масса листьев. Молодые листья затем измельчали и погружали в раствор, содержащий 2%

Таблица 1

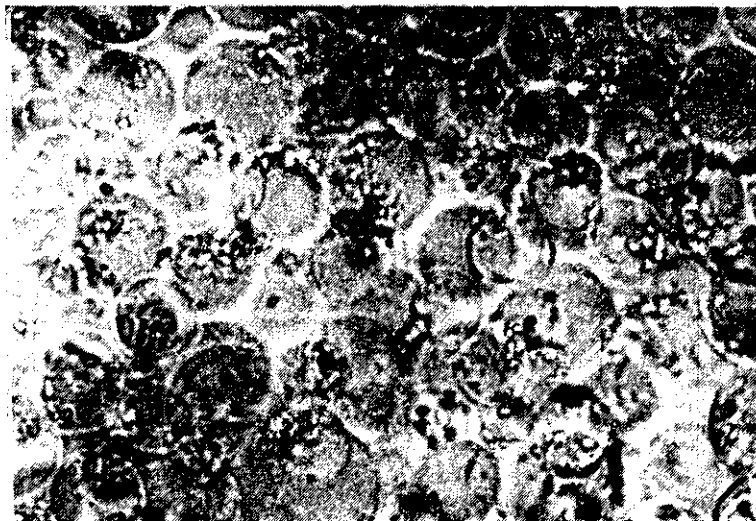
*Влияние сахарозы на рост (см) полученных из множественных почек проростков риса и массу их листьев (мг)*

*Effects of sucrose on the growth of multishoots originated rice plantlets and leaf harvest*

Показатели	Концентрация сахарозы в среде, М			
	0,1	0,2	0,3	0,4
Возраст				
1 неделя	10	7	5	4
4 недели	18	25	30	20
Масса листьев в одной колбе	100	200	700	200

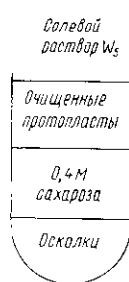
драйселазы, 0,4 М глюкозу и разбавленную втрое среду МС, и выдерживали в течение ночи. Эффективность изоляции и очистки протопластов представлена в табл. 2.

Одинаково просто выделять протопласты из каллусов и непосредственно из молодых листьев. Количество протопластов из листьев было достаточным для их дальнейшего культивирования после очистки от осколков и раствора фермента (рисунок). Протопласты риса имеют свойство находиться в виде суспензии в растворе 0,4 М сахарозы и не «всплывать», как другие мезофильные протопласты. В среде  $W_5$  содер-



Протопласты из множественных почек риса  
Protoplasts from multishoots of rice

жащей в 500 мл 1500 мг NaCl, 9200 мг CaCl<sub>2</sub>, 400 мг KCl, 500 мг глюкозы, протопласты «оседают», но в значительной степени разрушаются и смешиваются с осколками. Применение двухфазного центрифугирования, как показано на схеме, дает наиболее вы-



сокую эффективность очистки и позволяет получать до 80 % изолированных протопластов, что вполне достаточно для начала роста культуры с оптимальной плотностью.

Таблица 2  
Эффективность изоляции и очистки протопластов методом двухфазного центрифугирования

*Efficiency of isolation and purification by two-phase centrifugation*

Размер протопластов, мкм	Количество протопластов, млн шт.			
	В пробе 100 мг	После очистки (%)	В растворе $W_5$	В растворе 0,4 М сахарозы
5—9	3,2	2,3 (73)	0,9	Очень мало
10—25	8,0	6,2 (77)	1,1	0,73
Более 25	0,9	0,7 (77)	0,2	0,07
Всего	12,1	9,2 (75)	2,2	0,80

Приведенные выше результаты позволяют сделать вывод, что проростки, происходящие из гаплоидных множественных почек риса, могут служить хорошим источником гаплоидных протопластов. Используя выращиваемые *in vitro* множественные почки, можно изменять способы предобработки и процедуру культивирования протопластов для упрощения процессов их изоляции и последующего культивирования. Мы надеемся также, что изолированные таким способом протопласты могут быть сопоставимы с мезофильными протопластами, выделенными непосредственно из нормальных и интактных растений, и являться основой физиологически и эпигенетически гомогенного стерильного материала для работы с гаплоидными протопластами в течение всего года и в любых климатических условиях. Такая система, вероятно, перспективна для риса, злакового растения, а также для других растений, в том числе и двудольных, при модельных исследованиях *in vitro*.

#### A SIMPLE METHOD FOR ISOLATION OF HAPLOID PROTOPLASTS FROM FORMS OF RICE MULTISHOOTS

Huynh Xuan Thao, Trinh Manh Dung, Ngo Ke Suong

Institute of Experimental Biology, Ho Chi Minh City, Vietnam

#### Summary

One-month old sterile plantlets grown on the 0.3 M sucrose medium were used for protoplast isolation. The young part of leaves were cut onto small pieces (1 mm) and left for over night incubation in the 2% v/v driselase solution containing glucose 0.4 M. Isolated protoplasts were purified by two-phase centrifugation (the upper phase contains solution of salts, the lower one—0.4 M of sucrose and other nutritional constituents). The purified protoplasts were suspended between two phases.

1. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources* / C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun et al. // *Sci. Sinica.*— 1975.— N 5.— P. 659—668.
2. *King P. J., Potrykus I., Thomas E. In vitro genetics of cereals: problem and perspectives* // *Physiol. Veg.*— 1978.— 16, N 2.— P. 381—399.
3. *Further studies on plantlet production from cultured tissues of Sorghum bicolor* / D. I. Dunstan, K. C. Short, H. Dhaliwal et al. // *Protoplasma.*— 1979.— 101, N 4.— P. 355—361.
4. *Thomas E., King P. J., Potrykus I. Improvement of crop plants via single cells in vitro — an assessment* // *Z. Pflanzenzucht.*— 1979.— 82, N 1.— P. 1—30.
5. *Vasil I. K. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses* // *Genetic engineering in eukaryotes* / Eds P. F. Lurquin, A. Kleinhofs.— New York: Plenum Publ. Co., 1983.— P. 233—252.
6. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.*— Киев: Наук. думка, 1984.— 160 с.
7. *Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 4.— P. 473—497.

Ин-т эксперим. биологии Нац. центра  
науч. исследований СРВ, Хошимин

Получено 04.06.86

УДК 579.887.111:579.252

### В ДНК МИКОПЛАЗМ, ОБЛАДАЮЩИХ ПОДВИЖНОСТЬЮ, ОБНАРУЖЕНЫ ФРАГМЕНТЫ, ГОМОЛОГИЧНЫЕ ГЕНУ АКТИНА ЭУКАРИОТ

О. А. Чернова, Н. А. Меркулова, С. Н. Борхсениус

Микоплазмы — собирательное название представителей класса *Mollicutes* — самых малых из свободноживущих прокариотических организмов. Большинство микоплазм — симбионты, многие — паразиты, некоторые микоплазмы — возбудители болезней человека, животных, растений [1, 2]. Как правило, они неподвижны, но некоторые патогенные микоплазмы, в частности, *Mycoplasma pneumoniae* (возбудитель атипичной пнев-