Растителни биотехнологии и приложението им в селекцията

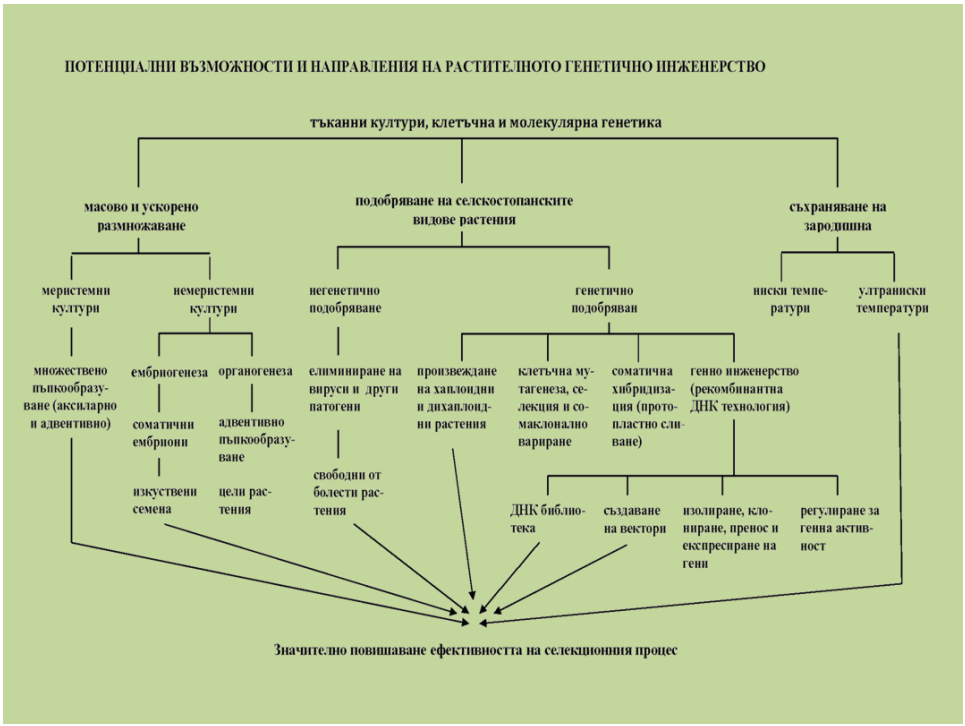
Проф.д-р Димитър Диманов

Същност на биотехнологиите

Класически биотехнологии-основаващи се основно на ферментационните процеси

Съвременни растителни биотехнологии:

- **Растителни тъканни и клетъчни култури**
- **Клетъчно инженерство /парасексуална или соматична хибридизация/**
- **Генно инженерство**



Същност на тъканните култури

ТОТИПОТЕНТНОСТ НА РАСТИТЕЛНАТА КЛЕТКА

Възможността за въвеждане в култура in vitro на всяка жива тъкан /респективно клетка/ независимо от растителния вид и регенериране на цяло растение от нея

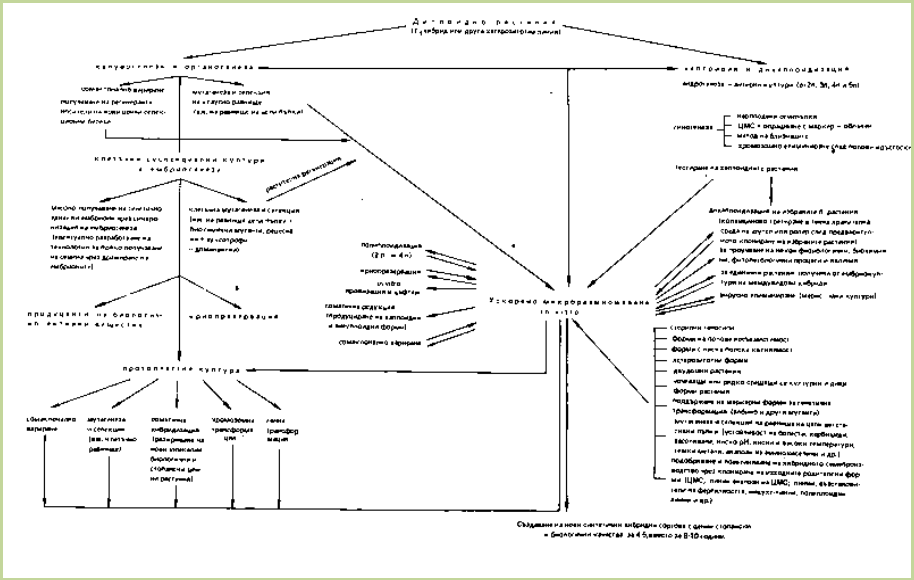


Направления

- Клонално микроразмножение
- Сомаклонално вариране
- Култура от незрели и зрели полови ембриони /зародиши/
- Преодоляване на стерилитета при отдалечена хибридизация
- Соматичен ембриогенез /изкуствени семена/
- Хаплоидия и дихаплоидия in vitro
- Клетъчна мутагенеза и селекция
- Изолирани протопласти и соматична хибридизация
- Молекулярна генетика. Генно инженерство

Клонално микроразмножение

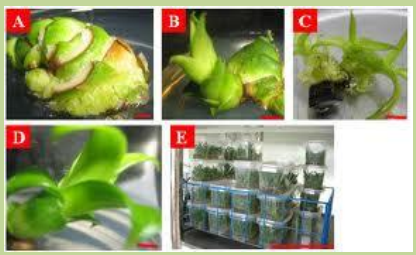
Възможности, които предлага клоналното микроразмножение за селекцията



По същество - вегетативно размножение на растения в епруветка

Задължително условие - възпроизвеждане на наследствения потенциал на изходното растение

Клоналното микроразмножение - с най-голяма търговска и икономическа стойност





Сомаклонално вариране

Същност и значение:

- **Повишаване на генетичното разнообразие, чрез тъканно култивиране на експланти от даден растителен вид**
- **Повишаване на възможността за селекция на линии с желаните качества**
- **Създаване на линии устойчиви на абиотичен и биотичен стрес/линии устойчиви на болести/**





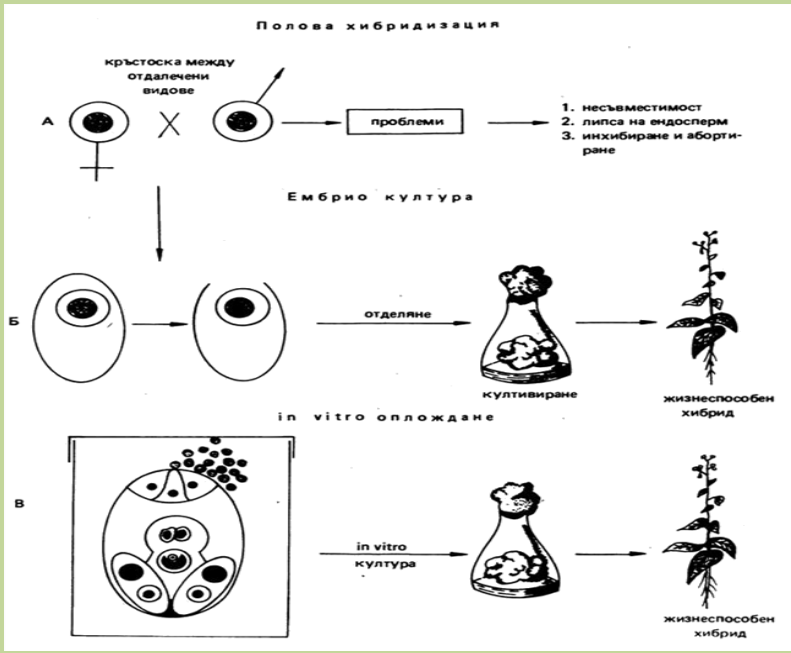


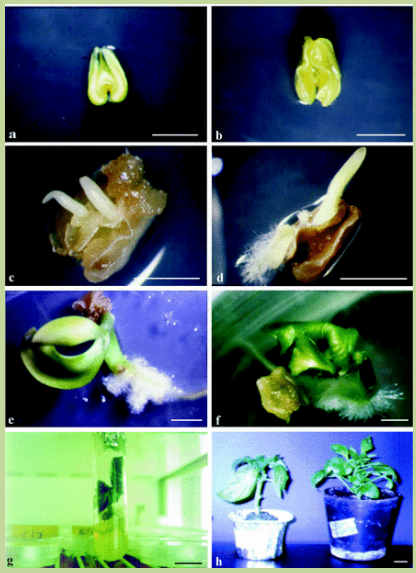
Култура от незрели и зрели полови ембриони. Преодоляване на стерилитета при отдалечена хибридизация

Значение:

- **Преодоляване на естествените бариери на несъвместимост за получаване на нови междувидови и междуродови хибриди**

В България за пръв път е преодоляна несъвместимостта при междувидови хибриди при тютюн - Доросиев и съавт./1976/ и Загорска, Никова, Шабанов и Попхристев/1983/


Полова хибридизация
кръстоска между отдалечени видове
А
проблеми
1. несъвместимост
2. липса на ендосперм
3. инхибиране и аборти-ране
Ембрио култура
Б
отделяне
култивиране
жизнеспособен хибрид
in vitro оплождане
В
in vitro култура
жизнеспособен хибрид


a
b
c
d
e
f
g
h

Соматичен ембриогенез

Значение:

- **Възможност за създаване на изкуствени семена**



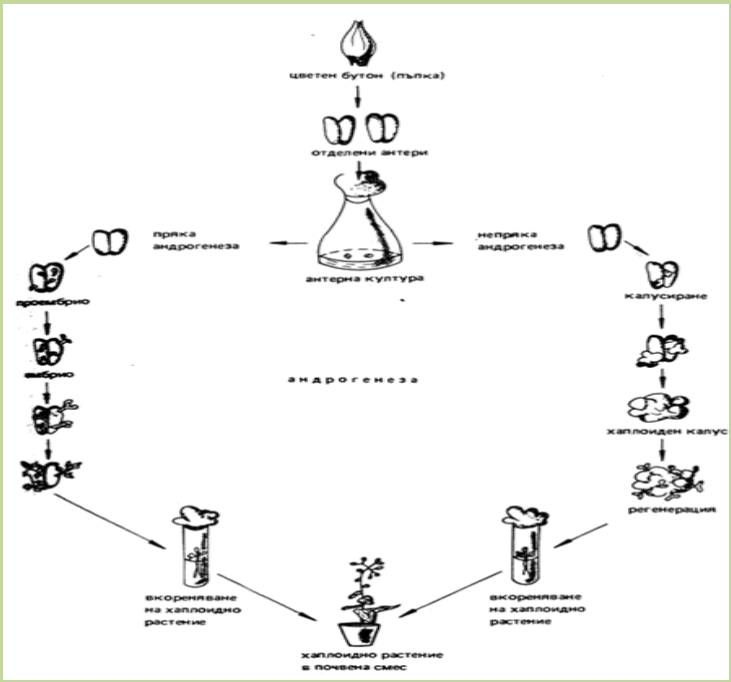
Соматичен ембриогенез

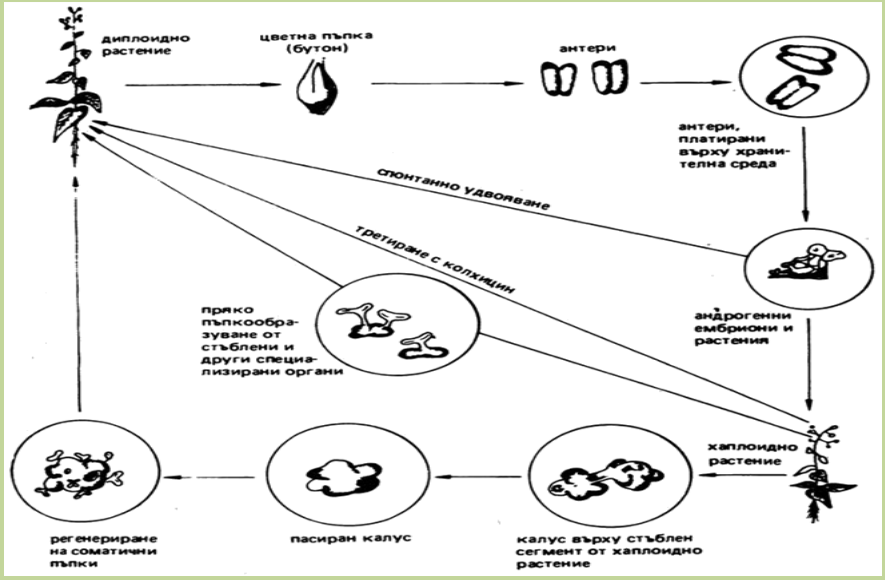
Хаплоидия и дихаплоидия in vitro

Първото съобщение за експериментално получаване на хаплоиди при растения принадлежи на академик Дончо Костов-1929 г.

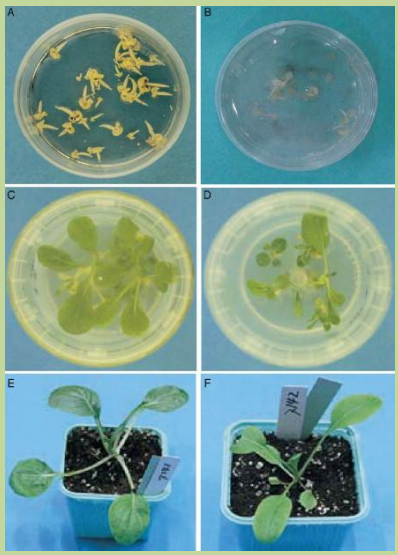
Значение:

- **Чрез хаплоидизация и последваща дихаплоидизация бързо изравняване и съкращаване на селекционния процес при хибридизация**
- **Получаване на дихаплоидни линии и сортове с ценни за селекцията признаци, обусловени от рецесивни алели**





Методи за получаване хомозиготни дихаплоиди от андрогенно получени хаплоиди

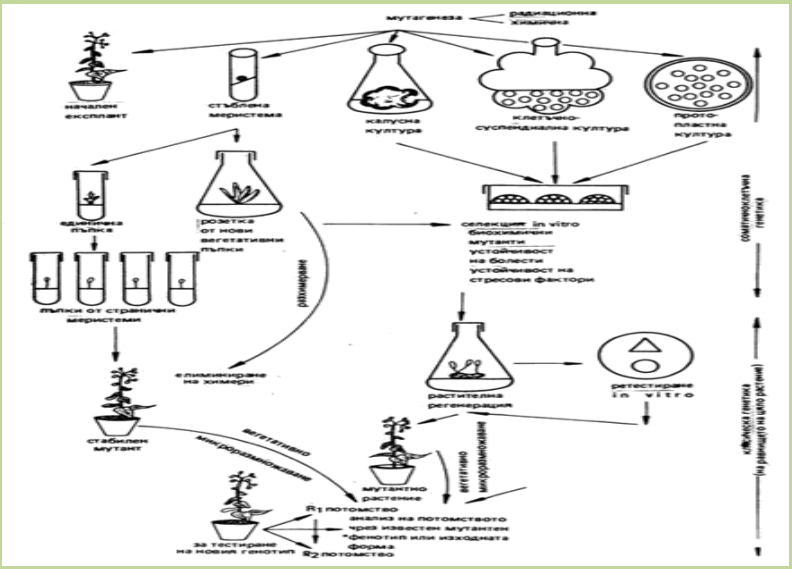


Клетъчна мутагенеза и селекция

Същност:

- **Целта е създаване на сортове с важни икономически качества, устойчиви на абиотичен и биотичен стрес/засушаване, измръзване, засоляване, устойчивост на болести и неприятели/**
- **За разлика от сомаклоналното вариране при кл. мутагенеза се прилага третиране на култивираните тъкани и клетки с мутагенни физични и химични агенти**

Основни фази за провеждане на мутационна селекция in vitro



Изолирани протопласти и соматична хибридизация

Изолиране на протопласти и регенерация на растения

Протопласт-клетка лишена от клетъчната стена

Ключов момент - регенериране на цяло растение

Дава възможност за:

- **Включване на клетъчни органели, микроорганизми или чужд генетичен материал, за да се създадат генетично реконструирани клетки**
- **Създаване на хибридни клетки, чрез сливане на протопласти /създаване на хибриди и цибриди/**

Методи за изолиране на протопласти

- **Механичен метод**

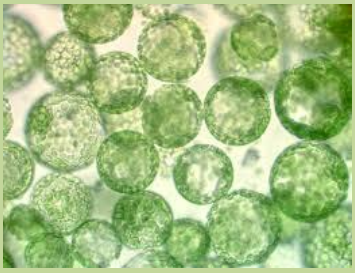
Терминът „протопласт“-въведен от Ханщайн през 1880г. изолира протопласти от Вошерия.

Изолиране на протопласти от висши растения-Клеркер-1892г.

- **Ензимен метод**

Въздействие върху клетъчната стена на растителната клетка основно с две групи ензими: пектинази и целулази

Пръв-Професор Кокинг/от коренчета на домати/-1960г.





Мезофилни протопласти

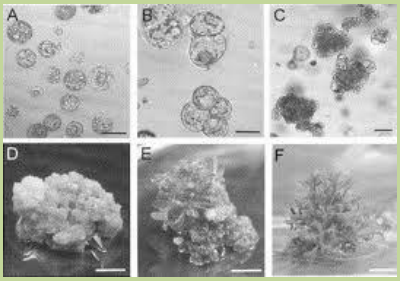




Суспендиални протопласти



Протопласти, третирани с флуоресциращи вещества



Фази на развитие след изолиране на протопластите – от протопласти до получаване на регенеранти

ПАРАСЕКСУАЛНА ИЛИ СОМАТИЧНА ХИБРИДИЗАЦИЯ

/КЛЕТЪЧНО ИНЖЕНЕРСТВО/

Ограничения при половата хибридизация:

1. **Селекционният процес, основан на полова хибридизация, е много дълъг**
2. **Половата хибридизация е възможна само между филогенетически близки групи растения**
3. **Прехвърляне на известно/малко /количество/ гени. Половият процес е симетричен/двата родителя предават на потомството равен хаплоиден набор от гени/ и за получаване на желания хибрид са необходими многократни възвратни кръстосвания**

Същност и значение:

- **За разлика от половата хибридизация, методът на соматичната хибридизация е изцяло изкуствен**
- **Разширява рамките на кръстосваемостта**
- **Получаване на симетрични и „асиметрични“ хибриди**
- **Получаване на цибриди**
- **Прехвърляне на клетъчни органели**

Методи за протопластно сливане

Механичен

Таунсенд-1897 г. и Кюрстер-1909 г.

Химично сливане на протопласти

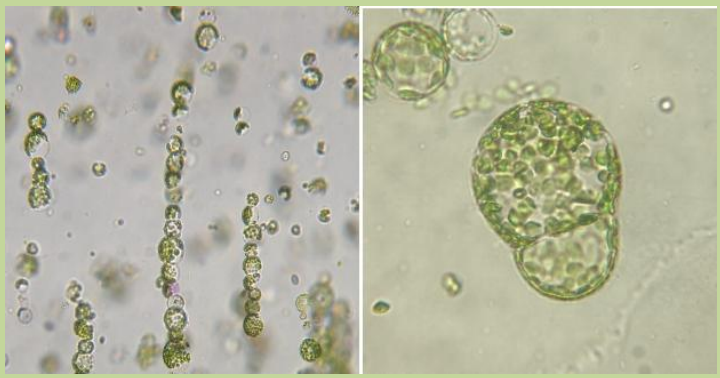
За пръв път-сътрудници на Кокинг през 1970 г., чрез сливане с фюзгена Na NO3

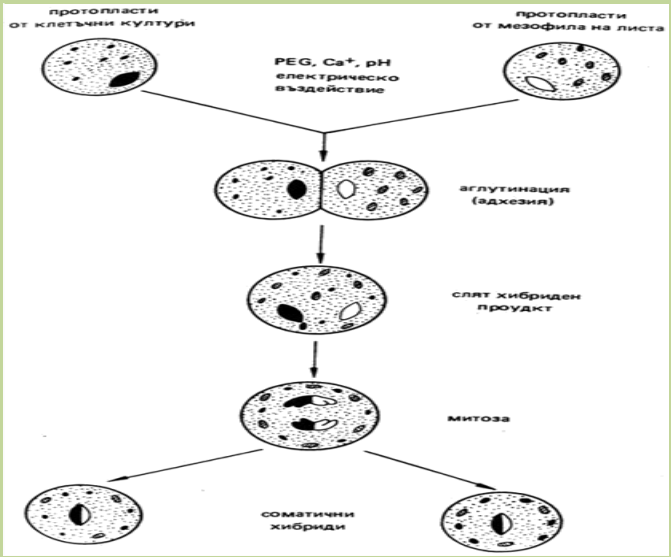
Основен метод за химично сливане:

PEG+високо pH+високо Ca2+ съдържание

Първият соматичен хибрид е създаден между N. glauca и N. langsdorffii през 1972 г. в Брукхеванската Национална Лаборатория на САЩ от Карлсон и сътрудници

Първият соматичен хибрид в България е създаден през 1987 г. в ЦЛГИ-Костинброд между N. tabacum/Виржиния 89/ и N. alata от аспирант Димитър Диманов с ръководител Ат. Атанасов.



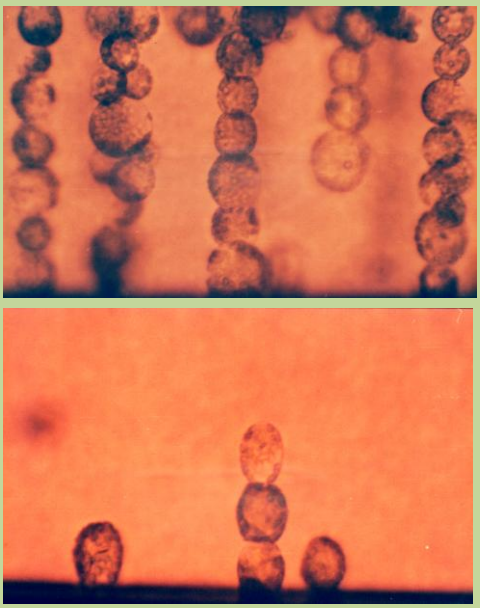


Принципна схема за сливане на растителни протопласти

Електросливане на растителни протопласти

Протича в две фази:

- **Диелектрофореза, посредством много слаб ток-подреждане на протопластите във верижка**
- **Последващ ел. импулс с висок интензитет за няколко милисекунди-перфорация на плазмалемата**





Методи за селекция на хибридните продукти

- **Визуална идентификация и механичен отбор**
- **Генетична комплиментация**
- **Физиологична комплиментация**
- **Третиране с метаболитни инхибитори и йонизиращи лъчения**

Анализ на соматичните хибриди

- **Генетичен**
- **Биохимичен**
- **Цитологичен анализ на хибридните продукти**

