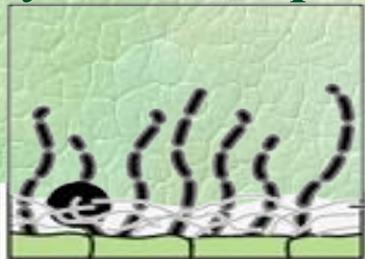




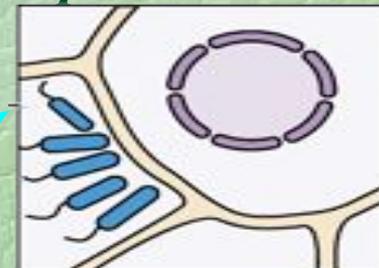
Биотехнология растений

Разнообразие патогенов

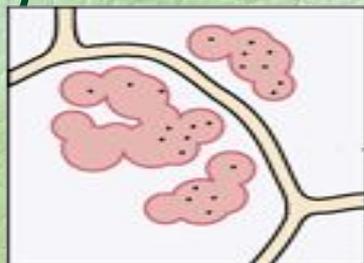
Мучнистая роса



Бактериальная сыпь



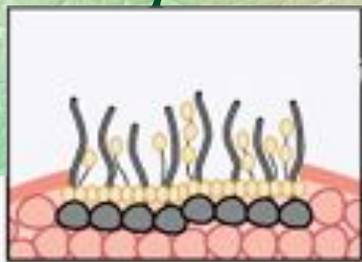
Крапчатый вилт



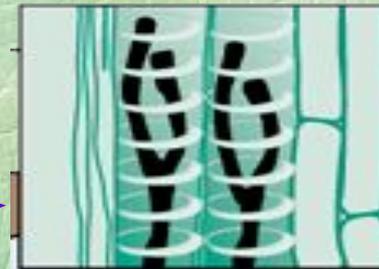
Вирус мозаики томата



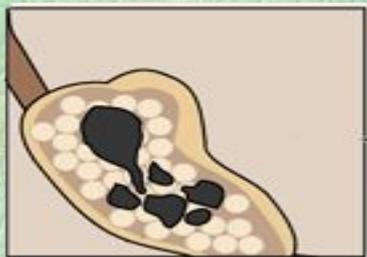
Антракноз



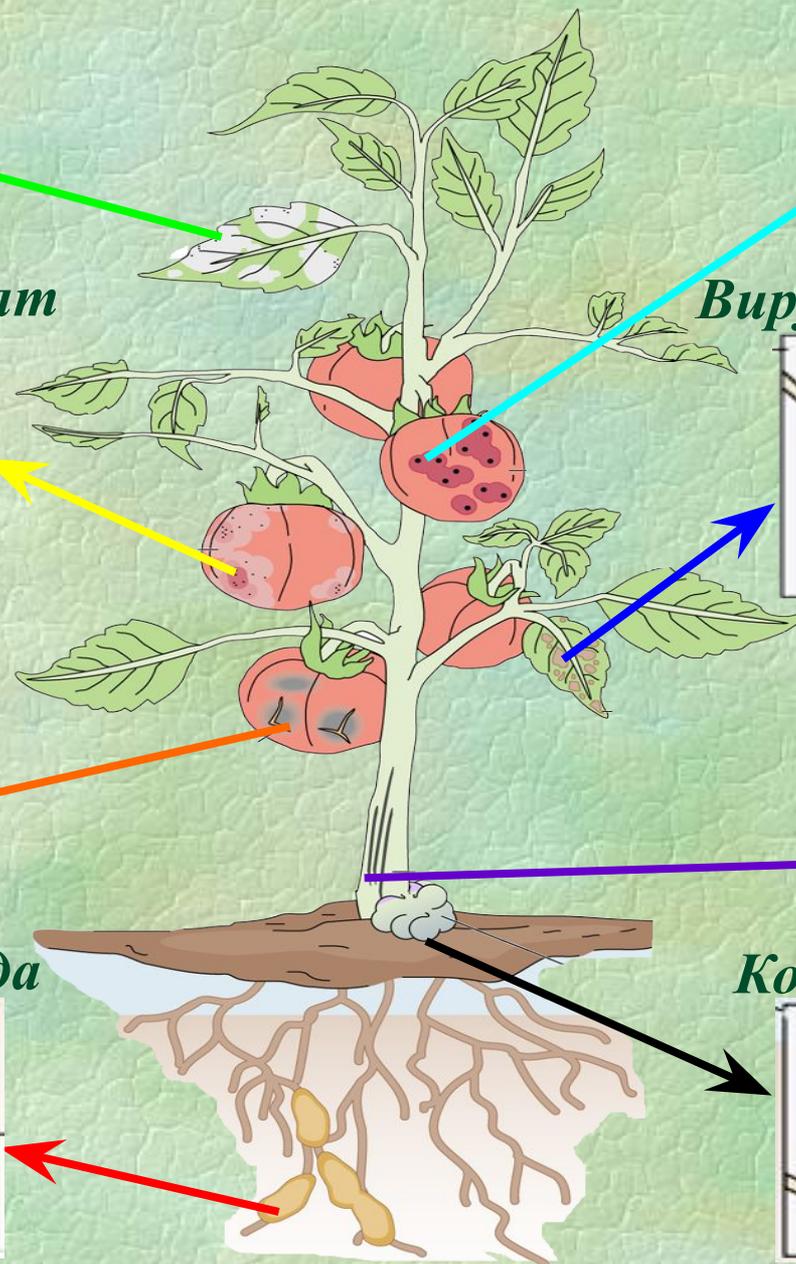
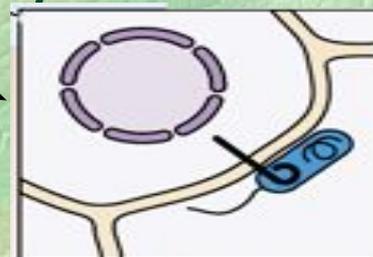
Fusarium вилт



Корневая нематода



Корончатый галл



Принципы клеточной селекции

Мутагенез (радиационный, химический)
Исходный эксплант



Мутагенез in vitro

Основные мутагены, используемые в клеточной селекции и некоторые аспекты их применения

Химические

1. **Этилметансульфонат (ЭМС)**

2. **N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ).**

Применяется для получения мутантов устойчивости к аналогам аминокислот, к аналогам нуклеиновых кислот; для получения некоторых ауксотрофов

3. **N-этил-N-нитрозомочевина (НЭМ).** Используется для

получения мутантов устойчивости к хлорату, аналогам аминокислот; для получения мутантов, дефектных по нитроредуктазе

Физические

1. **γ-излучение.** Используется для получения ауксотрофов, мутантов устойчивости к гербицидам и валину

2. **УФ-излучение.** Хорошо зарекомендовала себя при получении некоторых ауксотрофов и мутантов устойчивости к валину

3. **Рентгеновское излучение.** Применяется для получения пигментно-дефектных мутантов

Получение протопластов



Примеры позитивной клеточной селекции

1а. Устойчивость к селективному агенту на уровне:

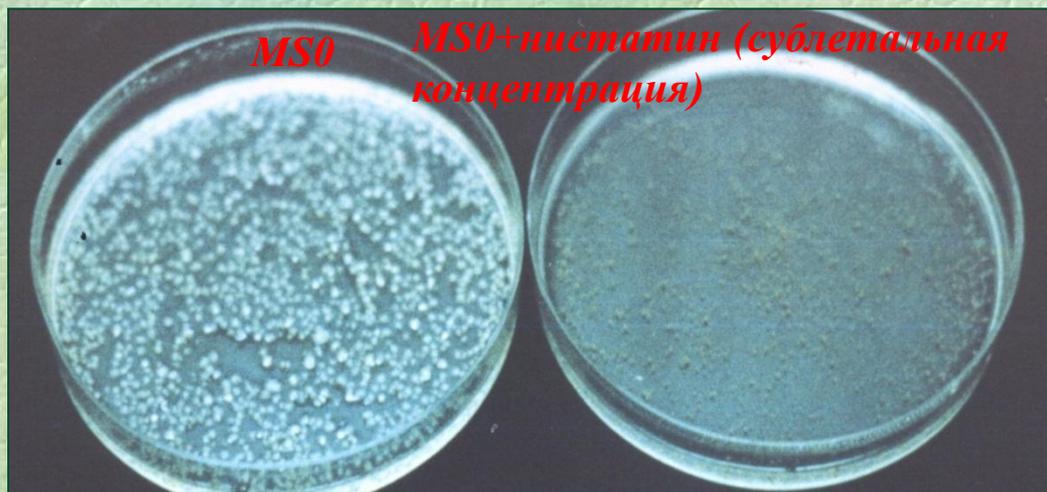
Устойчивость на уровне растения

Трансгенные растения



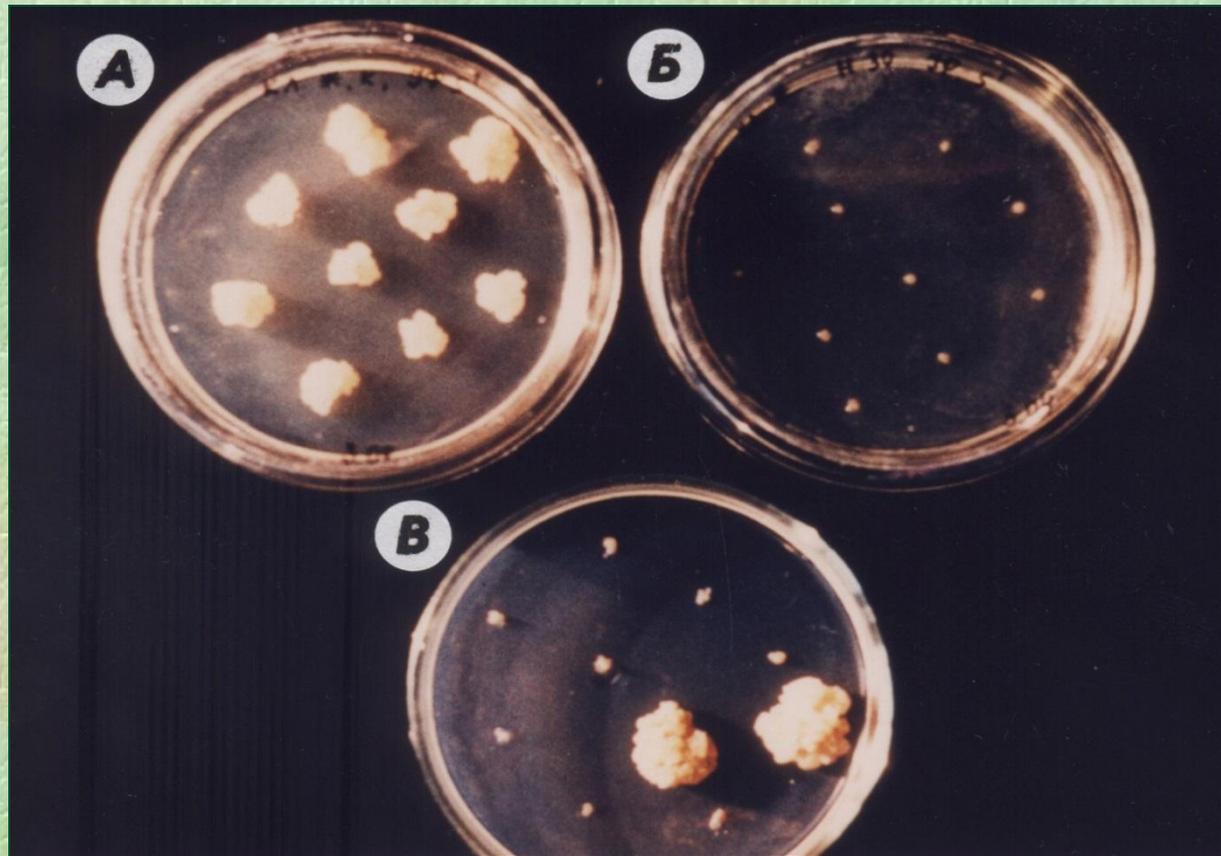
Nicotiana tabacum

Устойчивость на клеточном уровне



Протопласты картофеля

16. Устойчивость к полиеновым антибиотикам



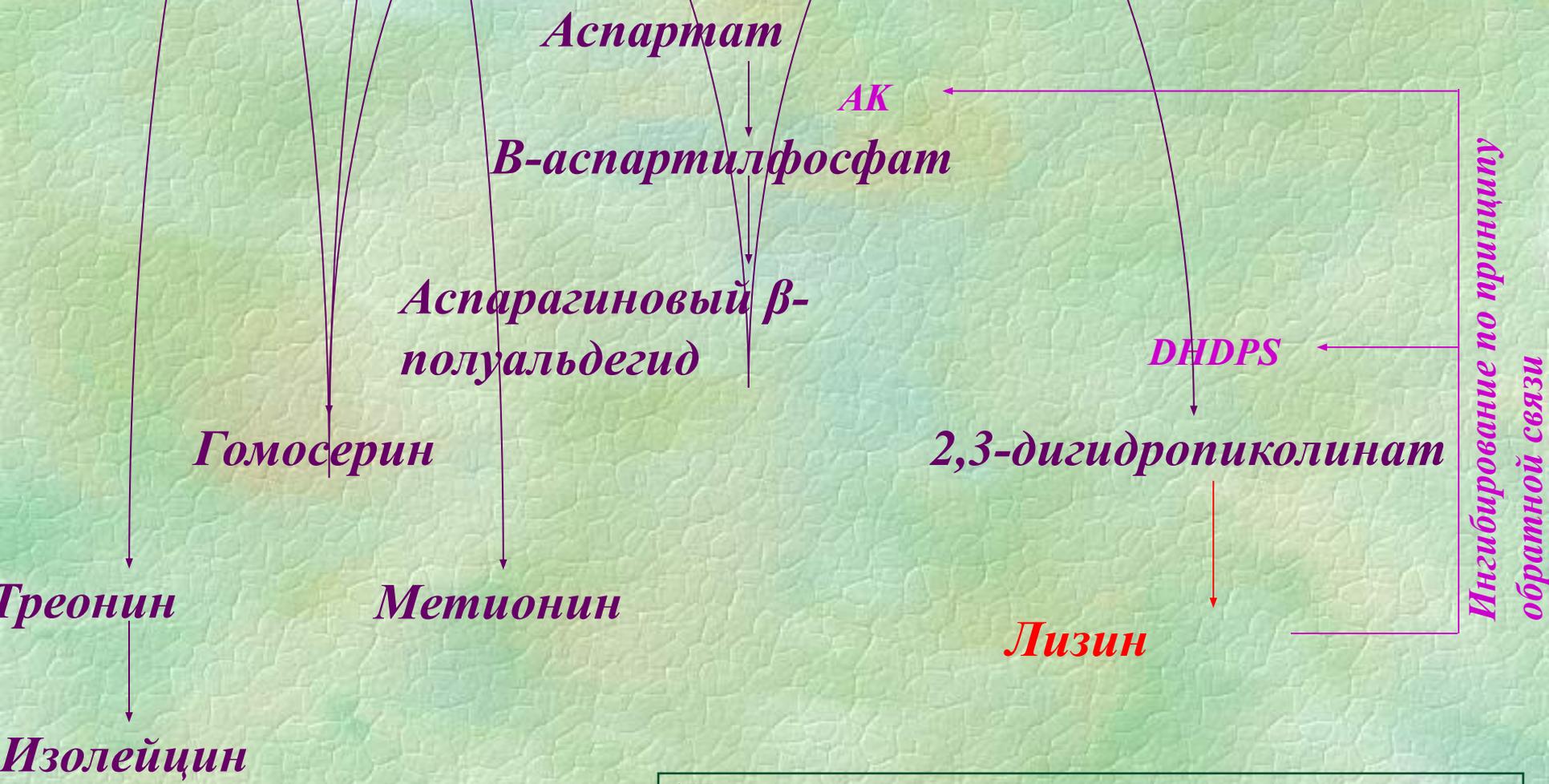
А. Каллусы табака на среде не содержащей селективный агент;

Б. Каллусы табака на среде, содержащей летальную концентрацию нистатина;

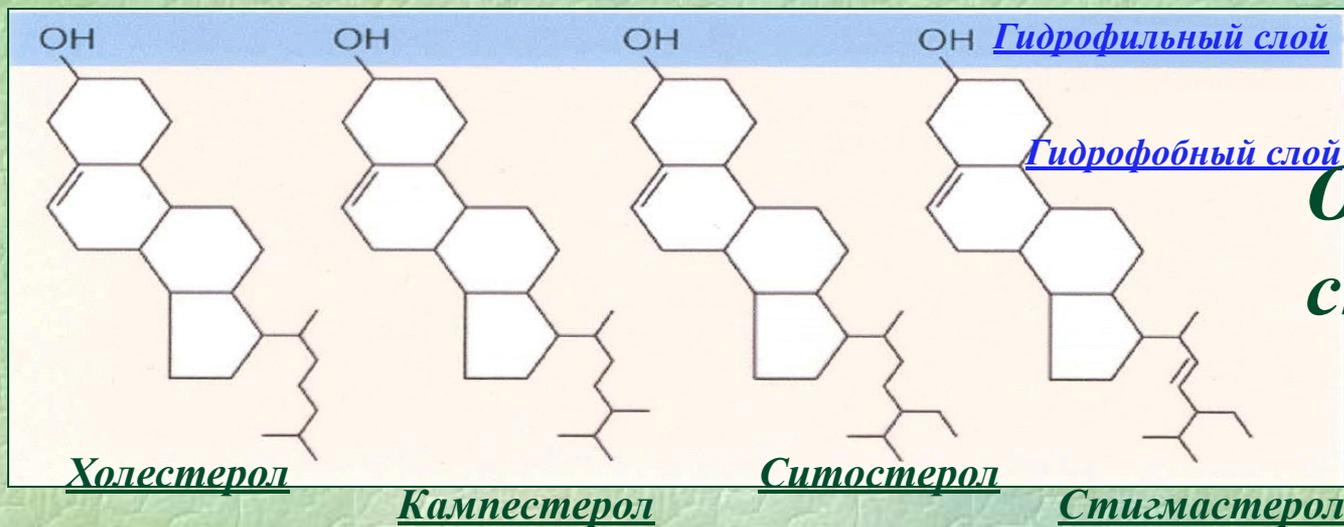
В. Каллусы табака на среде содержащей сублетальную концентрацию нистатина.

Устойчивость к аминокислотам и их аналогам

Биосинтез аминокислот, производных аспартата



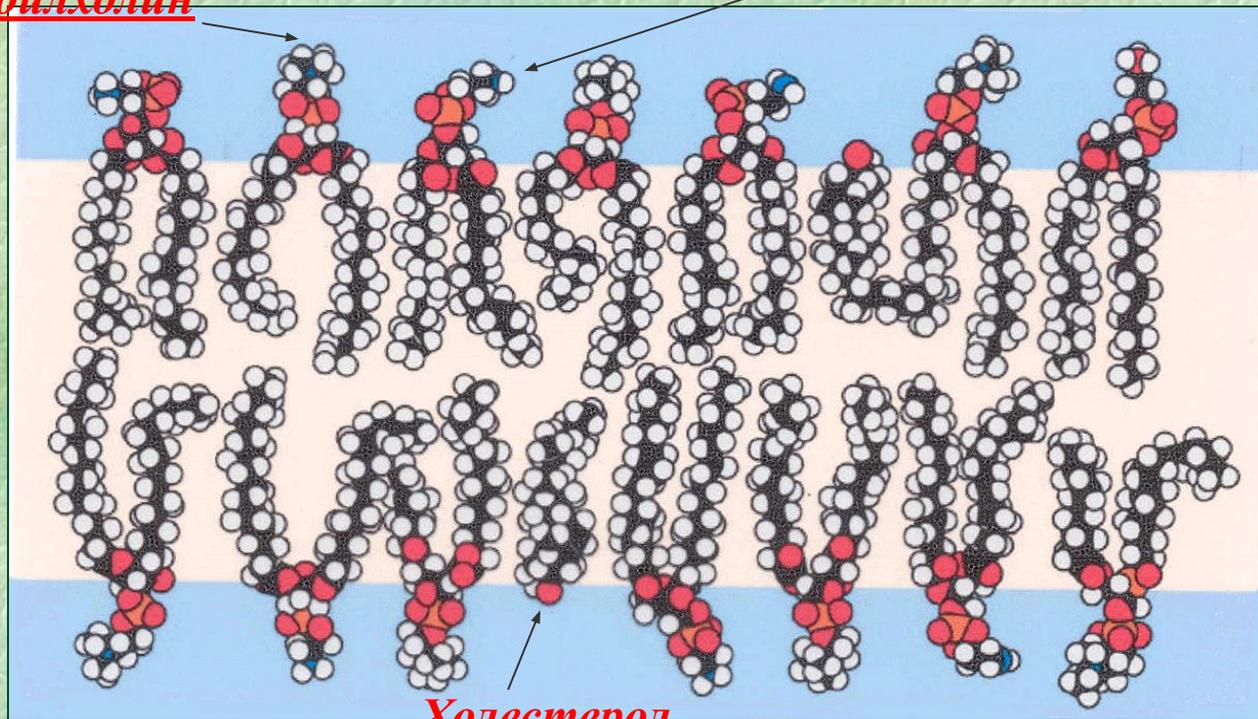
AK - аспараткиназа;
DHDPS - синтаза дигидропиколиновой кислоты



Основные стерины

Фосфотидилхолин

Фосфотидилэтаноламин

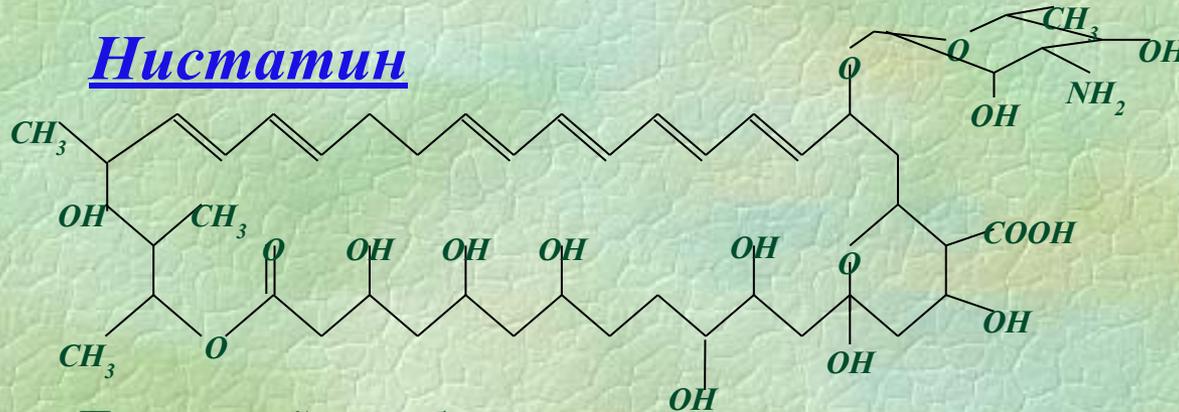


Холестерол

*Расположение в
мембране*

Вещества, изменяющие состав стероинов

Нистатин



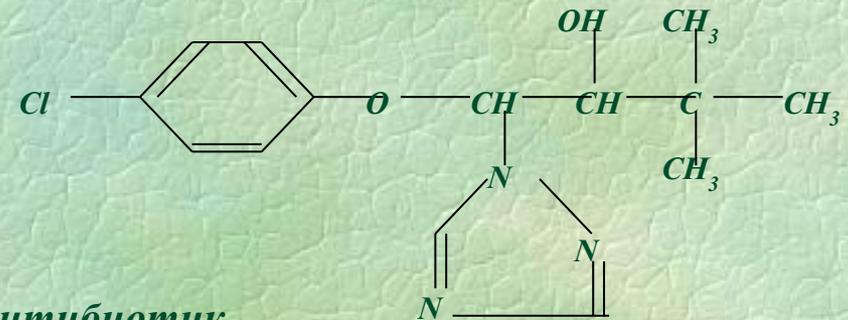
Фунгицид

Состав: **25% тридименола**
3% фуберидазола

Ингибитор цитохром Р-450-зависимой монооксигеназы, которая удаляет С-14 α метильную группу в процессе стероидного биосинтеза; приводит к накоплению С-14 α метилстеролов

Полиеновый антибиотик

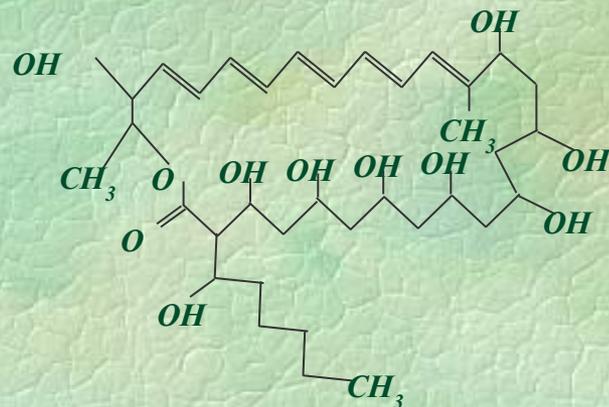
Образует комплексы со стеролами в клеточной мембране; приводит к изменению проницаемости мембраны и возможной гибели клетки



Полиеновый антибиотик

Состав: **филлипин III**
смесь 4х макролидов

Байтан



Связывает стеринны с образованием крупных плоских агрегатов между бислоями, что приводит к разрушению мембраны; комплекс филлипин-стерин локализуется в верхнем билипидном слое и вызывает деформацию мембраны

Филлипин

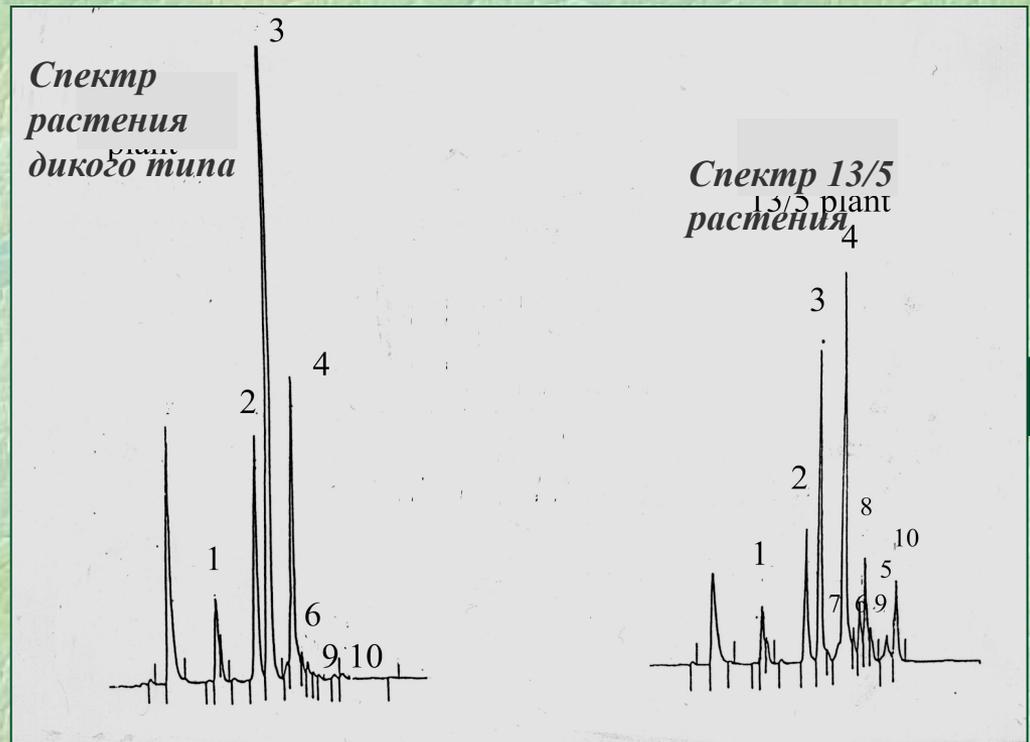
Получение растений с измененным содержанием стероидов



Процесс регенерации



Растение-регенерант (табак)



Спектры основных стеролов:

1. Холестерол, 2. Кампестерол,
3. Стигмастерол, 4. Ситостерол,
5. 24-метилен циклоартенол,
6. Циклоартенол, 7. D7-кампестерол,
8. D7-ситостерол, D7-авенастерол,
10. 24-этилдиен лофенол

Модель табак- дрозофила

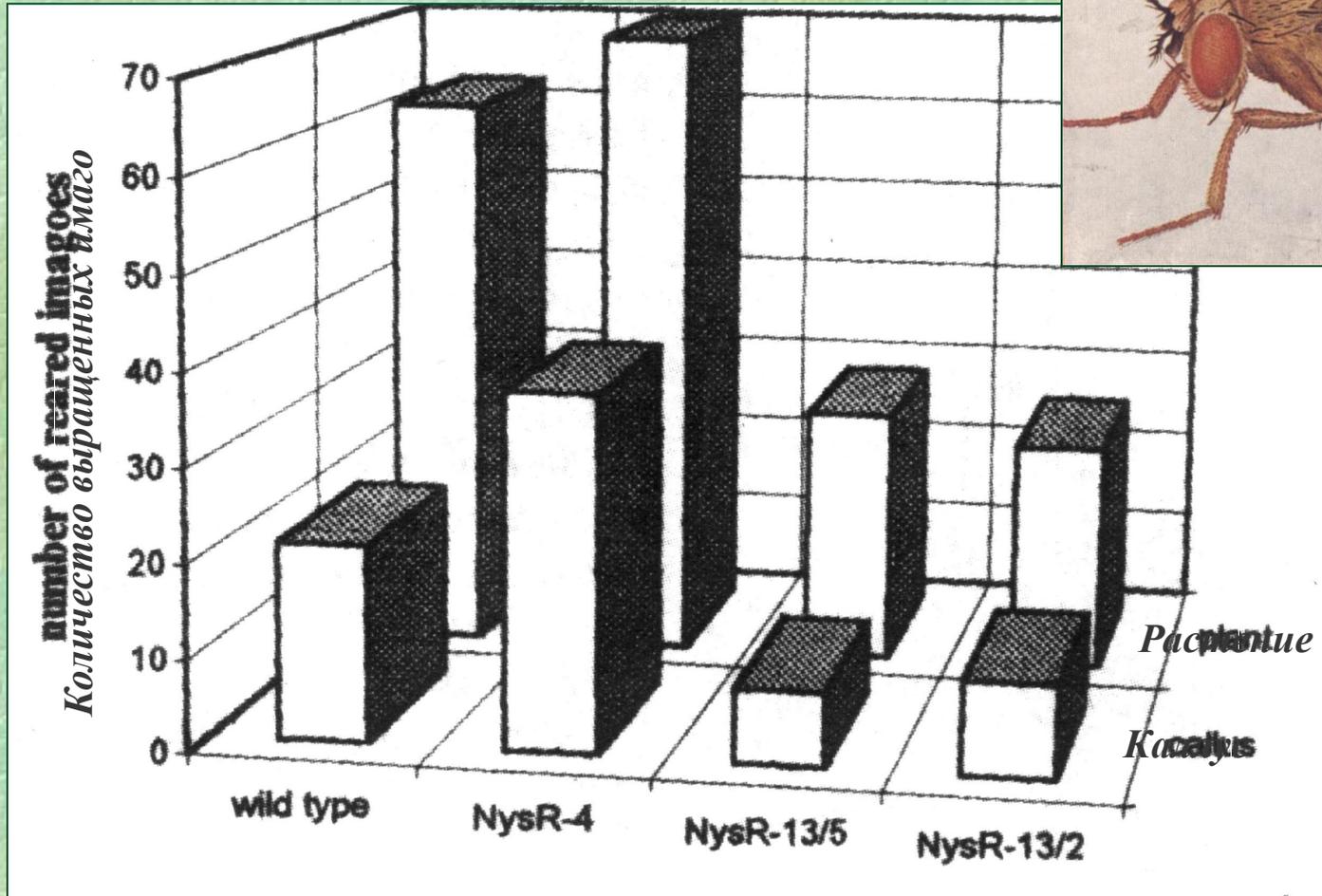
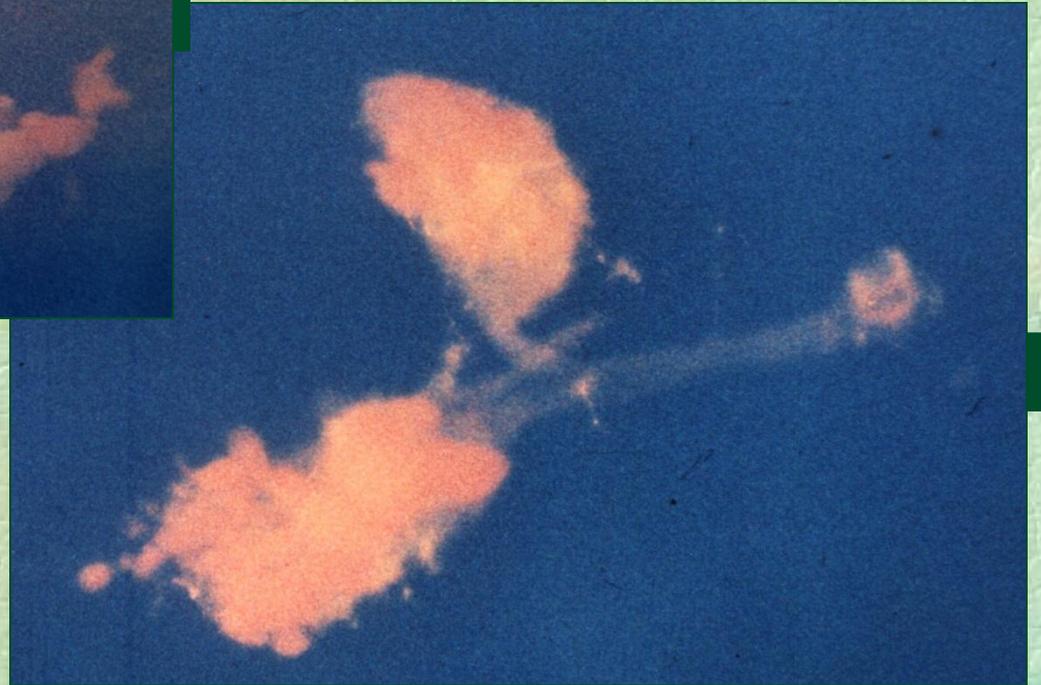


Диаграмма фертильности *Drosophilla* на среде содержащей гомогенат нистатин-устойчивых растений табака

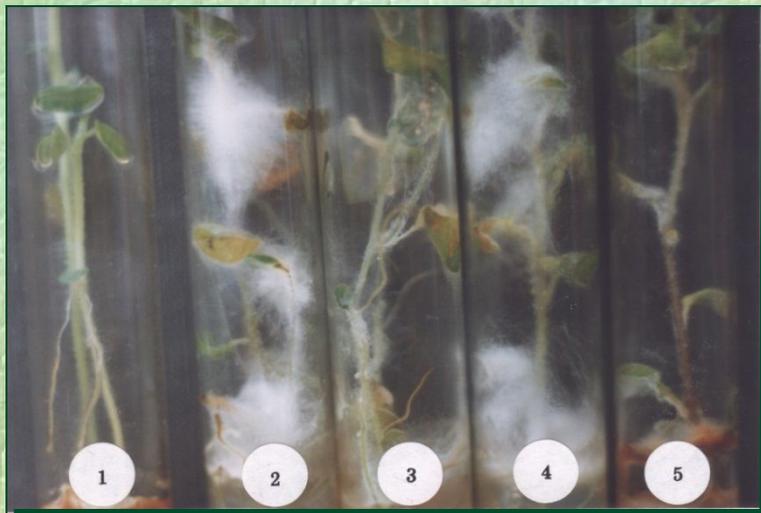
Модель табак- дрозофила



*Развитие яичников *Drosophilla* в норме (слева) и при стерольной диете (справа)*

Модель картофель - фитофтора

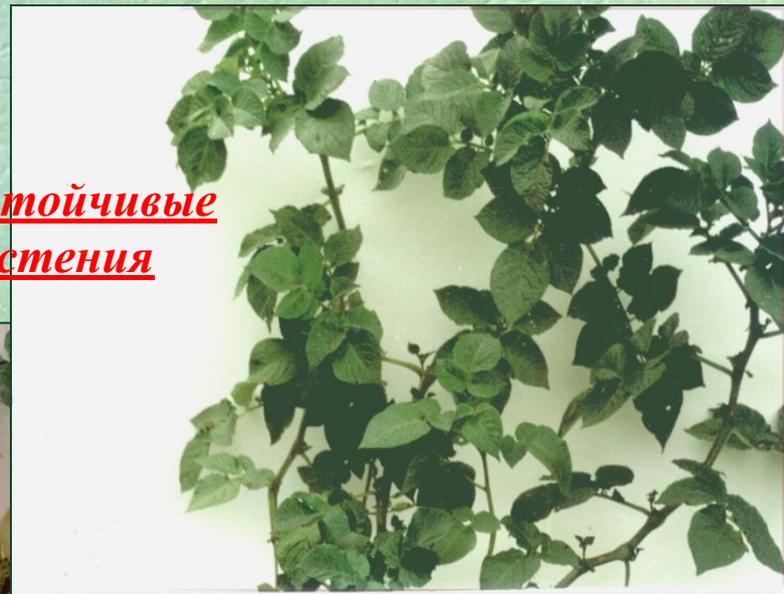
Устойчивые к *P. infestans* растения картофеля линии Rf18



Биотест in vitro:

2-5 растения с различным уровнем чувствительности

Устойчивые растения



Биотест in vivo

Контроль



Фенотип “dwarf” растений картофеля, устойчивых к филлипину

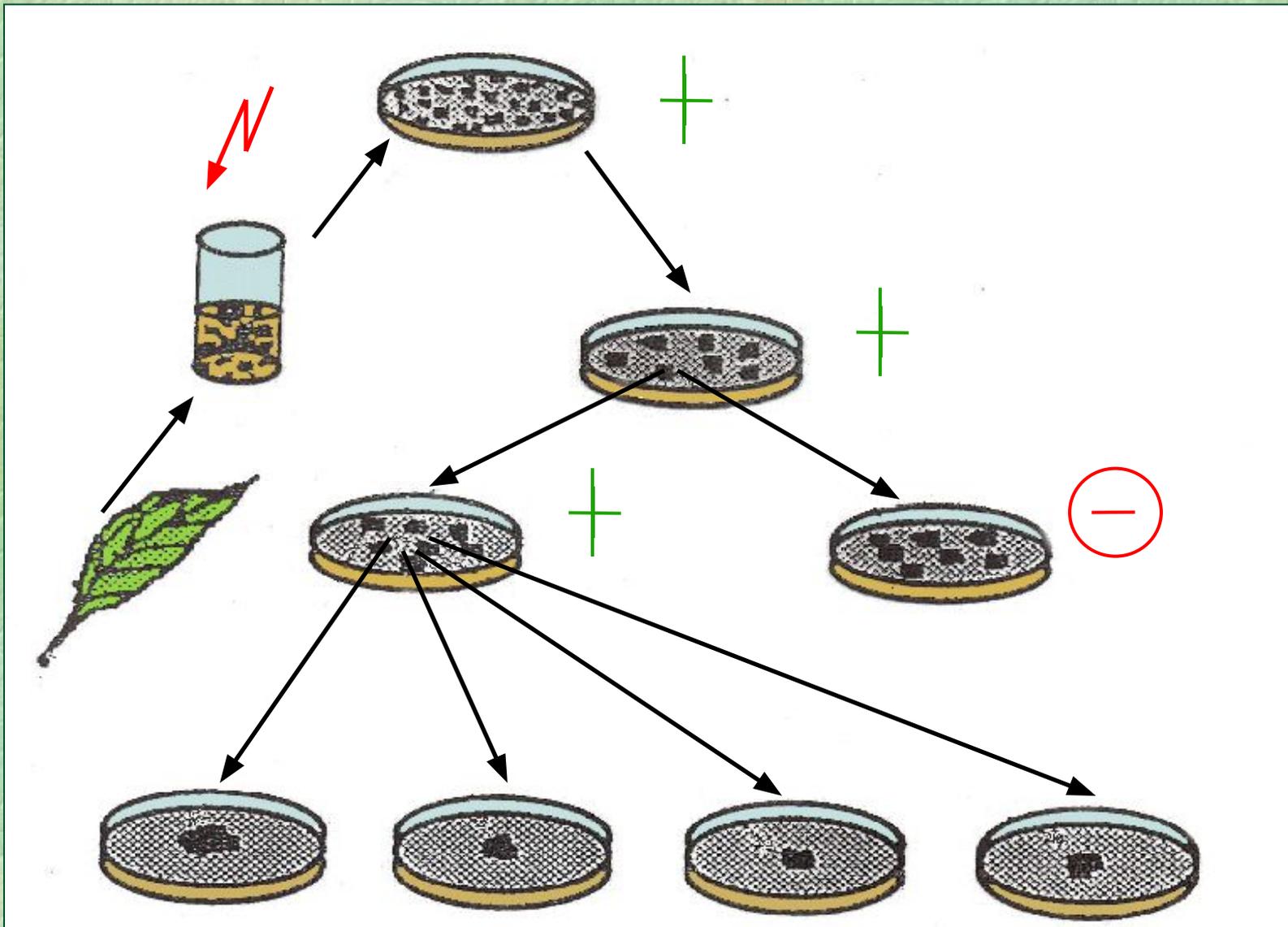


“Dwarf” растение картофеля линии Rb3 (слева) и растение дикого типа (справа)

Цветки Rb3 растения (в середине) и цветки растения дикого типа (по бокам)



Негативная клеточная селекция



Частота возникновения ауксотрофных клонов у *N. plumbaginifolia*

<i>Доза, *</i> <i>гр</i>	<i>Выживаемость, **</i> <i>%</i>	<i>Число (частота)</i>	
		<i>тестируемых клонов</i>	<i>ауксотрофов</i>
<i>13</i>	<i>57</i>	<i>3727</i>	<i>0</i>
<i>16</i>	<i>23</i>	<i>3705</i>	<i>0</i>
<i>19</i>	<i>15</i>	<i>2377</i>	<i>0</i>
<i>23</i>	<i>11</i>	<i>4420</i>	<i>3(8•10⁻³)</i>

** γ-лучи (⁶⁰Со-пушка, 0,042 гр/с)*

*** эффективность посева необлученных протопластов 70%*

Соматическая гибридизация



**Соматическая гибридизация – способ
получения соматических гибридов в
результате слияния протопластов разных
видов (ФОРМ).**

Техника получения соматических гибридов.

**1.Изоляция
протопластов**



2. Слияние протопластов различных форм.



**3. Идентификация и селекция соматических гибридных
клеток.**



**4.Культивирование гибридных
клеток.**



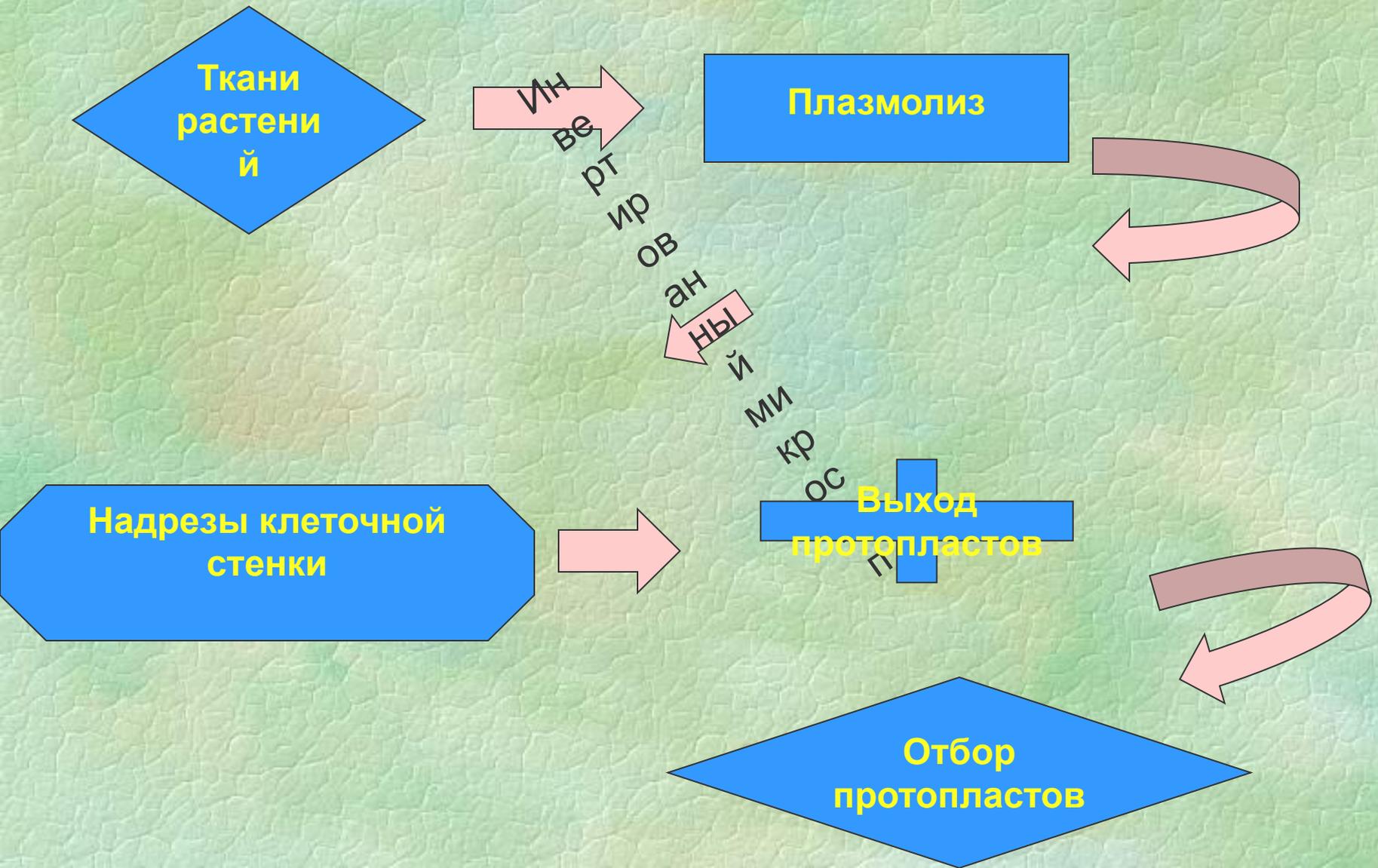
5. Регенерация гибридных растений

**Методы изоляции протопластов из
растительных тканей.)**

**1. Механический
метод**

**2. Энзиматический
метод**

1. Механический метод



1. Ограничения метода

- Можно использовать только вакуолизованные клетки.
- Низкий выход протопластов.
- Низкая жизнеспособность протопластов.

Энзиматический метод



Энзиматический метод

- используют для различных тканей растений
- мезофильные ткани используются наиболее часто
- высокий выход протопластов
- протопласты характеризуются высокой жизнеспособностью

Слияние протопластов

1. спонтанное
слияние

2.
индуцированное
слияние

химическое
слияние

механическое
слияние

электрослияние

СПОНТАННОЕ СЛИЯНИЕ

- протопласты сливаются в процессе изоляции и их физического контакта

индуцированное слияние

- **химическое слияние индуцируется химическими соединениями**

- **ТИПЫ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

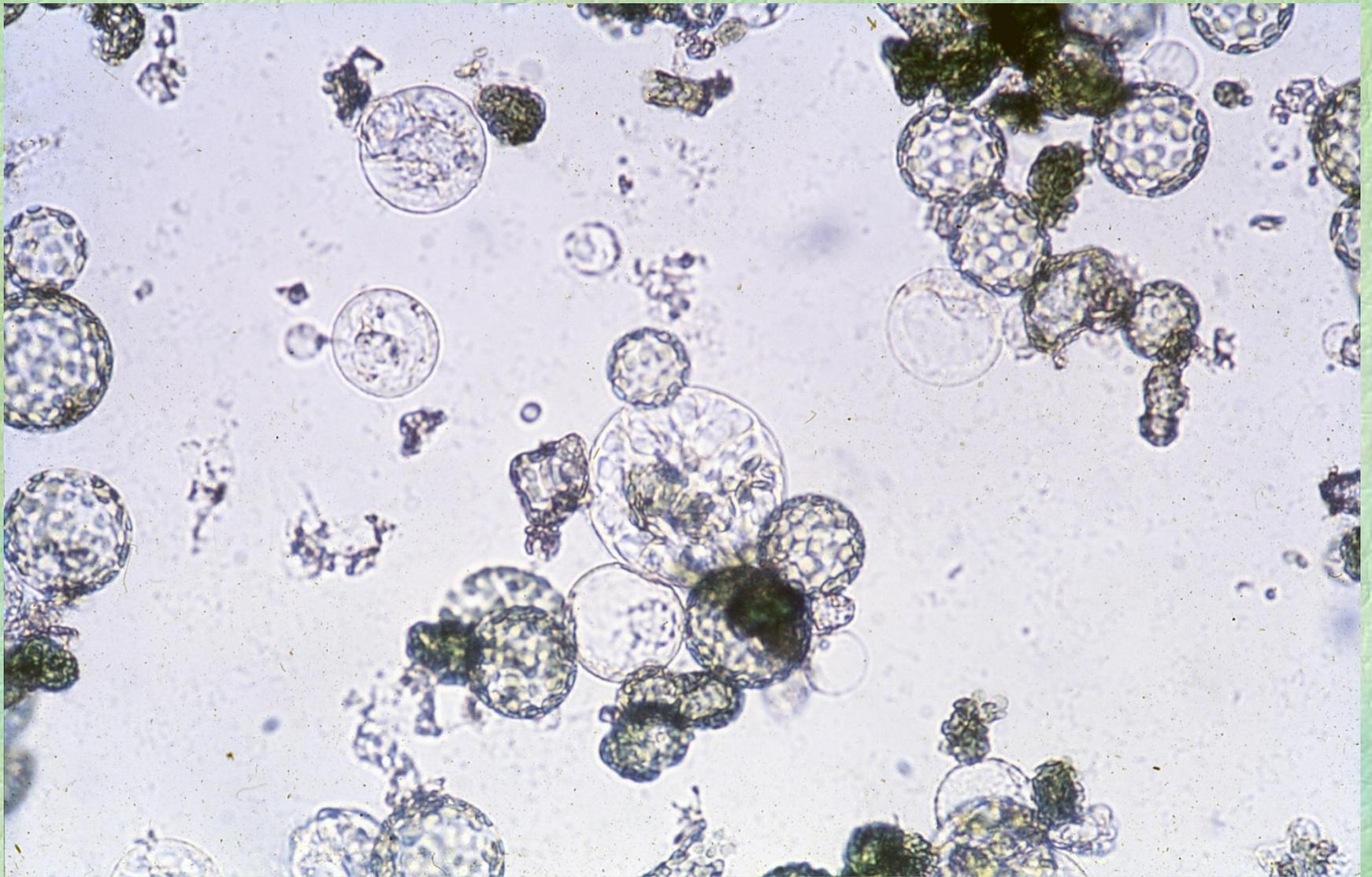
- PEG
- NaNO_3
- Ca^{2+} ions
- Polyvinyl alcohol

индуцированное слияние

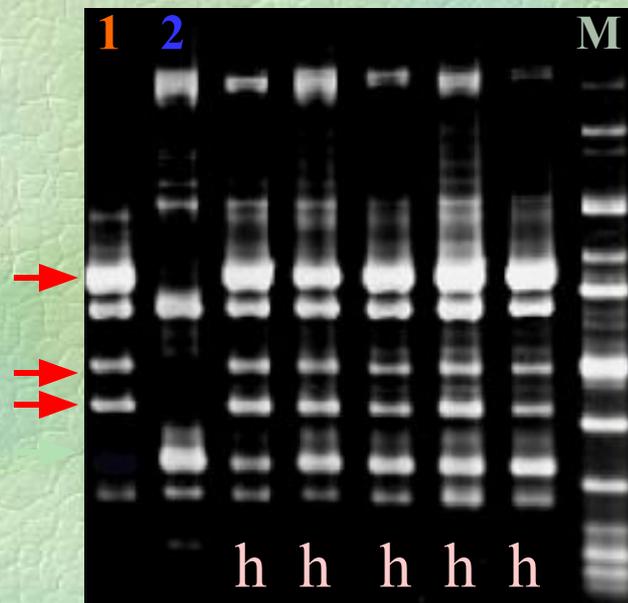
- механическое слияние (физическое слияние) –используют инвертированный микроскоп, микроманипулятор и микропипетки
- электрослияние- слияние, индуцируемое электрическим током

Идентификация и селекция соматических гибридов

- **идентификация гибридов основана на различиях между родительскими и гибридными клетками**
 - **пигментация**
 - **цитоплазматические маркеры (наличие-отсутствие хлоропластов)**
 - **использование ауксотрофных мутантов**
 - **физиологические различия родительских клеток**



Identification of the somatic hybrids using RAPD analysis



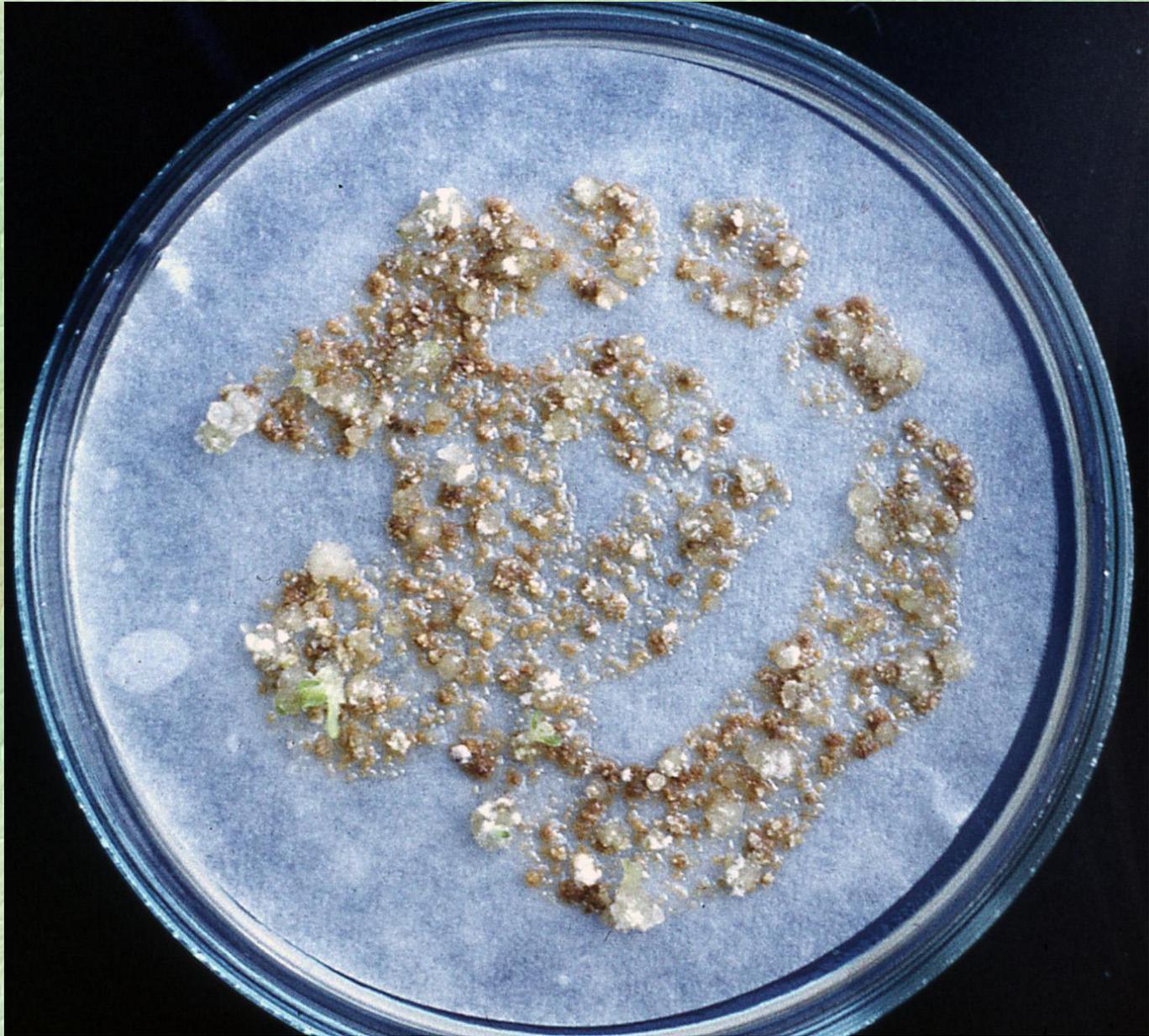
селекция гибридных клеток (используемые маркеры)

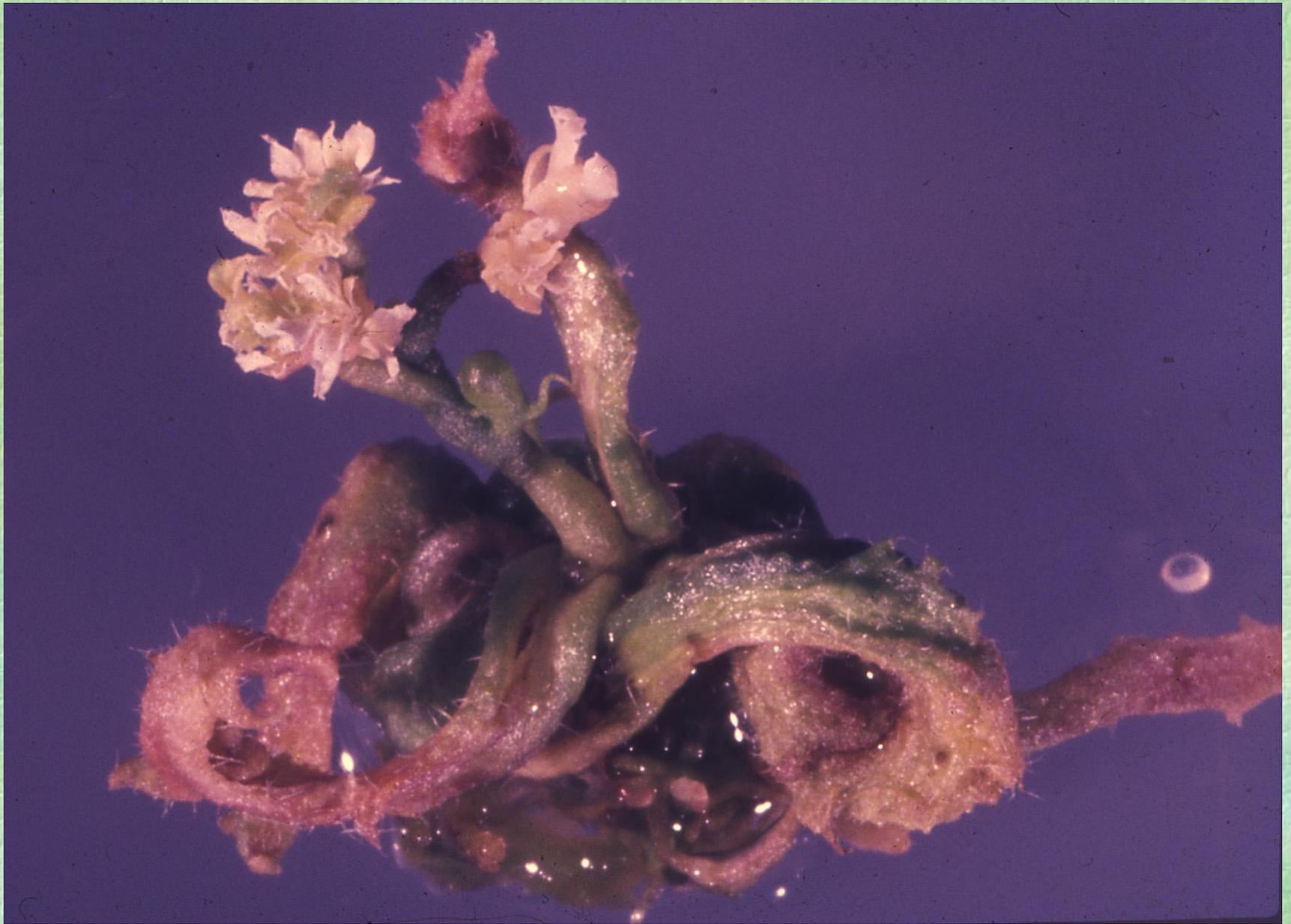
- **генетическая комплементация**
- **гормонезависимость по гормонам**
- **ауксотрофные мутанты и мутанты по метаболизму**
- **анализ хромосом**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ

- **получение новых межвидовых гибридов**
 - **Tomato (гибрид картофеля и томата)**
- **получение фертильных диплоидов и полиплоидов от стерильных гаплоидов, триплоидов и анеуплоидов**
- **перенос генов интереса, например, устойчивости от дикорастущих форм к культурным**

- изучение генов цитоплазматических детерминант
- анализ групп сцепления хлоропластов и митохондрий
- получение уникальных гибридов с разным сочетанием ядерных генов и генов цитоплазматических детерминант







E33

Hybrid



E47



Figure 1: Photos of leaves of two different mint types (E33, E47) as well as a leaf from a hybrid plant regenerated from fused protoplasts of these types (center).



PVY-infected potato plants () and resistant (→)
field growing somatic hybrids
Solanum tuberosum (+) *Solanum etuberosum*

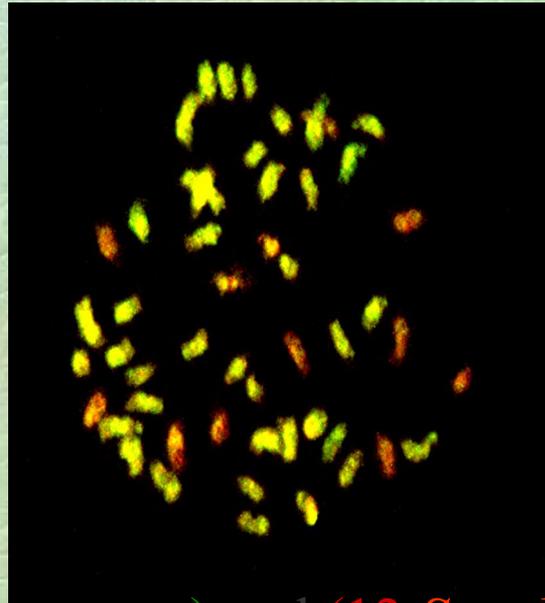
*Lycopersicon
esculentum*

Hybrid

*Solanum
bulbocastanum*



Genome composition of the BC₂ hybrid (AAAE)
determined by using GISH analysis



4x=(39 potato chromosomes) and (12 *S.etuberosum* chromosomes)

BC₂ hybrid derived from the sexual crosses of potato and
interspecific somatic hybrid

Solanum tuberosum (genome A) (+) *S.etuberosum* (genome E)



Thank

You

