

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ

Лекция 4





**«Селекция – это эволюция,  
направляемая волей человека»**  
*Н.И. Вавилов*



*СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ Лекция 4*

# **ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ**

# Словарь



**Аутбридинг** – скрещивание или система скрещиваний неродственных форм одного вида

**Гибридизация** – процесс получения гибридов, в основе которого лежит объединение генетического материала разных клеток в одной

**Гибриды** – потомство, полученное от скрещивания генетически различных родительских форм

**Инбридинг** – близкородственное скрещивание, скрещивание организмов, имеющих общих предков

**Полиплоиды** – кратное гаплоидному увеличению числа хромосом

# Традиционные методы селекции высших организмов



Подбор родительских пар

Гибридизация

Отбор

Получение полиплоидов

Испытание по потомству

аутбридинг

инбридинг

массовый

индивидуальный

# Традиционные методы селекции высших организмов



| Метод                   | Селекция животных                   | Селекция растений   |
|-------------------------|-------------------------------------|---|
| Подбор родительских пар | По ценным признакам и по экстерьеру | По месту происхождения (географически удаленных) или генетически отдаленных (неродственных) |



# Традиционные методы селекции высших организмов



| Метод                                   | Селекция животных  | Селекция растений   |
|---|--|---|
| Гибридизация неродственная (аутбридинг) | Скращивание отдаленных пород, для получения гетерозиготных популяций и проявления гетерозиса. Потомство бесплодное | Внутривидовое, межвидовое, межродовое скрещивание, ведущее к гетерозису, для получения гетерозиготных популяций |



Мулы – кросс между ослом и кобылицей

<http://zooclub.ru/horses/312.shtml>

# Традиционные методы селекции высших организмов



| Метод                                      | Селекция животных   | Селекция растений  |
|--|---|--|
| Гибридизация близкородственная (инбридинг) | Скращивание между близкими родственниками для получения гомозиготных (чистых) линий | Самоопыление у перекрестноопыляющихся растений для получения гомозиготных (чистых) линий |



<http://portalcats.com>



# Традиционные методы селекции высших организмов



| Метод                 | Селекция животных  | Селекция растений   |
|-----------------------|--|---|
| Отбор: массовый       | Не применяется   | Применяется в отношении перекрестноопыляющихся растений                   |
| Отбор: индивидуальный | Жесткий отбор по хозяйственно ценным признакам, выносливости, экстерьеру | Применяется в отношении самоопыляющихся растений, выделяются чистые линии |

# Традиционные методы селекции высших организмов



| Метод   | Селекция животных  | Селекция растений   |
|---|--|---|
| Гибридизация:<br>а) неродственная<br>(аутбридинг) | Скрещивание отдаленных пород, для получения гетерозиготных популяций и проявления гетерозиса. Потомство бесплодное | Внутривидовое, межвидовое, межродовое скрещивание, ведущее к гетерозису, для получения гетерозиготных популяций |

# Традиционные методы селекции высших организмов



**Методы**

**Селекция животных**

**Селекция растений**

**Метод испытания производителей по потомству**

**Искусственное осеменение от лучших производителей, качества которых проверяют по многочисленному потомству**

**Не применяется**



# Традиционные методы селекции высших организмов



| Методы                                  | Селекция животных | Селекция растений  |
|---|-------------------|--|
| Экспериментальное получение полиплоидов | Не применяется    | Применяется для получения более продуктивных, урожайных форм |

# Традиционные методы селекции микроорганизмов



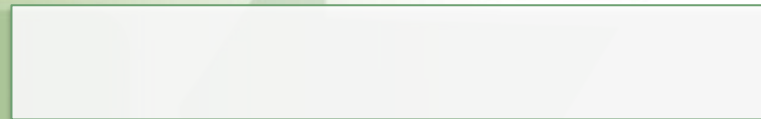
Мутагенез



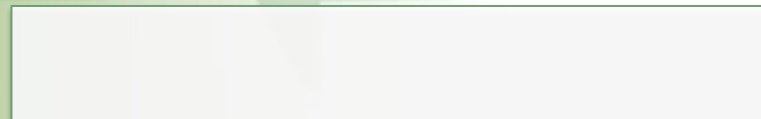
СПОНТАННЫЙ

Отбор

Геном - гаплоидный



Половое размножение - нет





*СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ. Лекция 4*

# **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ**

# Современные методы селекции



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫ Й

**искусственное изменение наследственного материала с целью получения мутаций**

*Модификация признака.  
Метод применим при условии  
наличия признака в геноме*

- спонтанный
- индуцированный

## ИНДУЦИРОВАННЫ Й

**искусственное перемещение фрагментов генома или компонентов клеток**

*Внедрение нового признака  
Метод позволяет вносить  
принципиально новые признаки*

- генная
- клеточная
- белковая



*СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ. Лекция 4*

# **МУТАГЕНЕЗ В СЕЛЕКЦИИ**

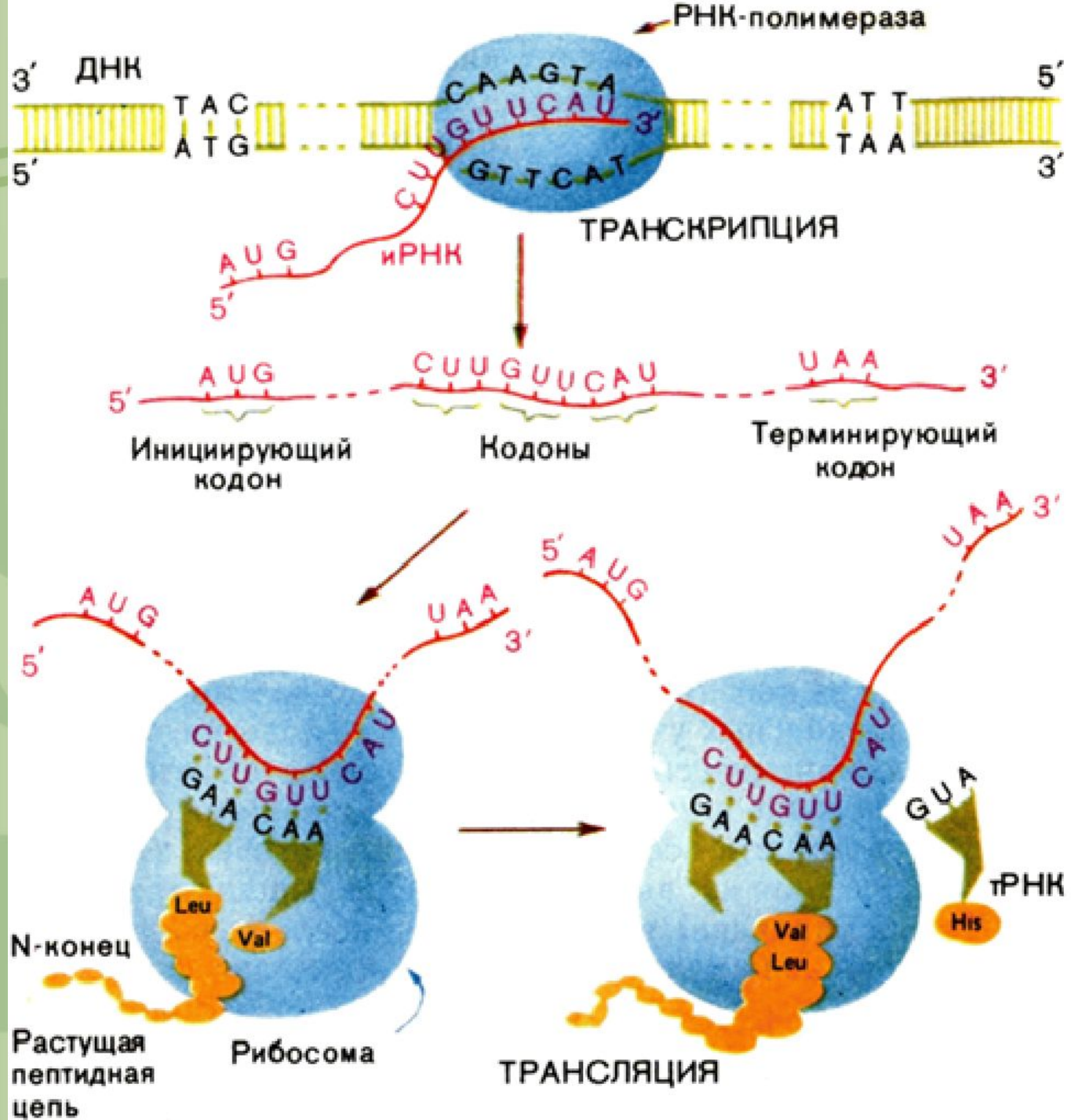
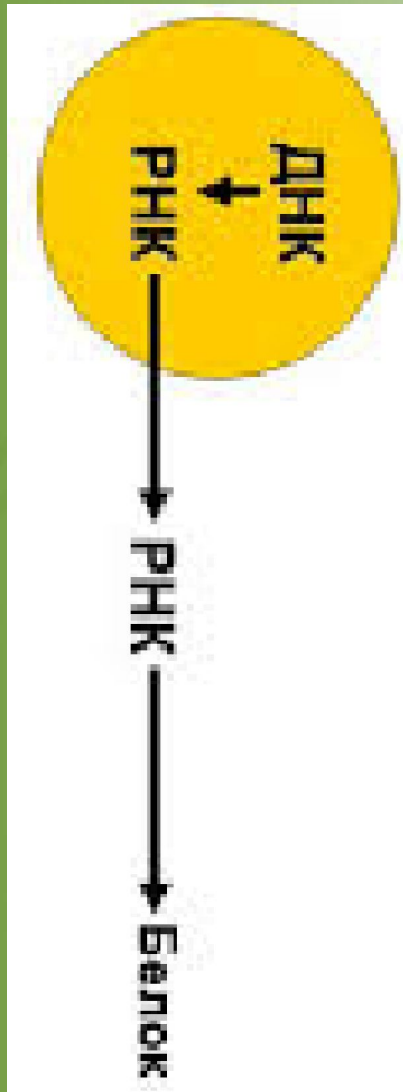


# Словарь



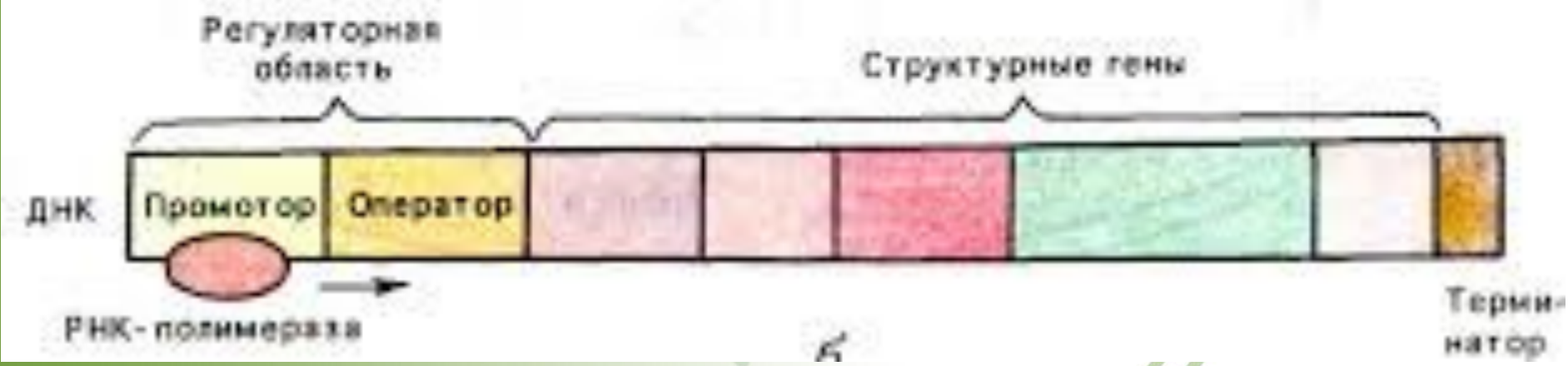
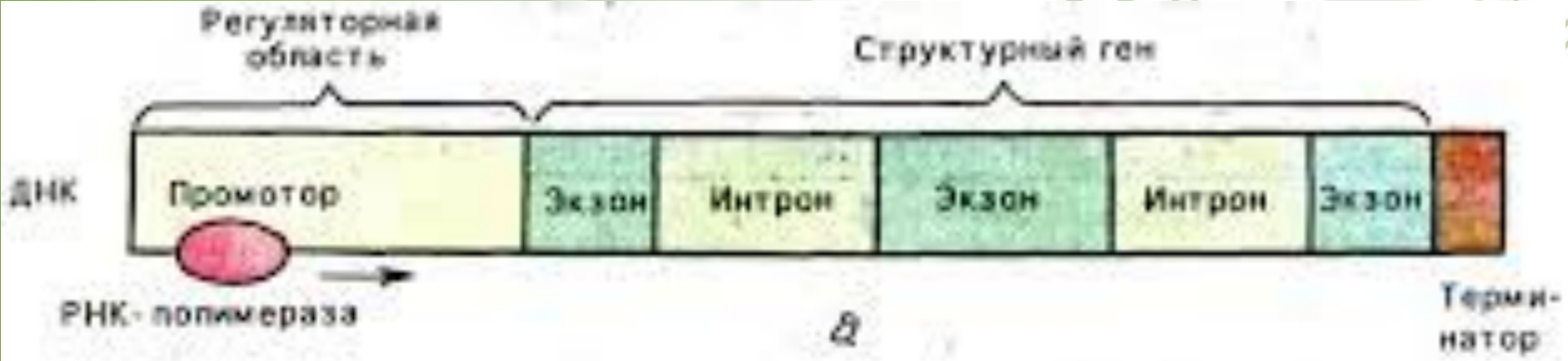
**Структурные (кодирующие) гены** – несут информацию о белках и последовательности нуклеотидов в РНК

**Регуляторные (функциональные) гены** – регулируют и модулируют экспрессию структурных генов

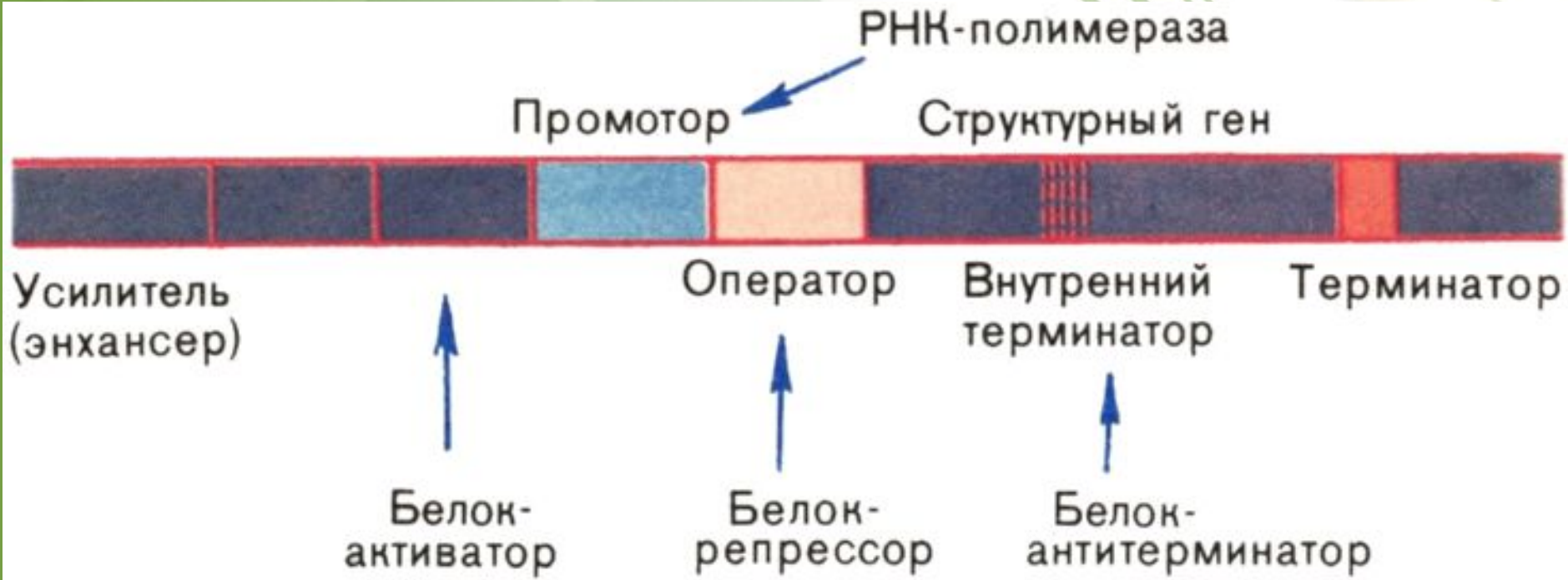


# Структурные гены

# Транскрипты



# Структурные и регуляторные гены



# Регуляторные гены



## •ГЕНЫ-РЕГУЛЯТОРЫ

- регулируют работу структурных генов

## •ПРОЦЕССИНГ ГЕНЫ

- регулируют посттранскрипционный и посттрансляционный процессинг

## •ТЕМПОРАЛЬНЫЕ ГЕНЫ

- включают в работу структурные гены в ходе клеточной дифференцировки



*СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. МУТАГЕНЕЗ. Лекция 4*

# **МУТАГЕНЕЗ В СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

# Требования к микроорганизмам- промышленным продуцентам



- Обладать высокой скоростью прироста биомассы и давать высокий выход целевого продукта при минимальных сырьевых затратах
- Проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов
- Быть конкурентными по отношению к другой микрофлоре и устойчивыми к вирусным инфекциям
- Растить на дешевых и доступных субстратах
- Быть безвредными для людей и окружающей среды

# Мутации, приводящие к сверхсинтезу



## Мутации в структурных и регуляторных генах

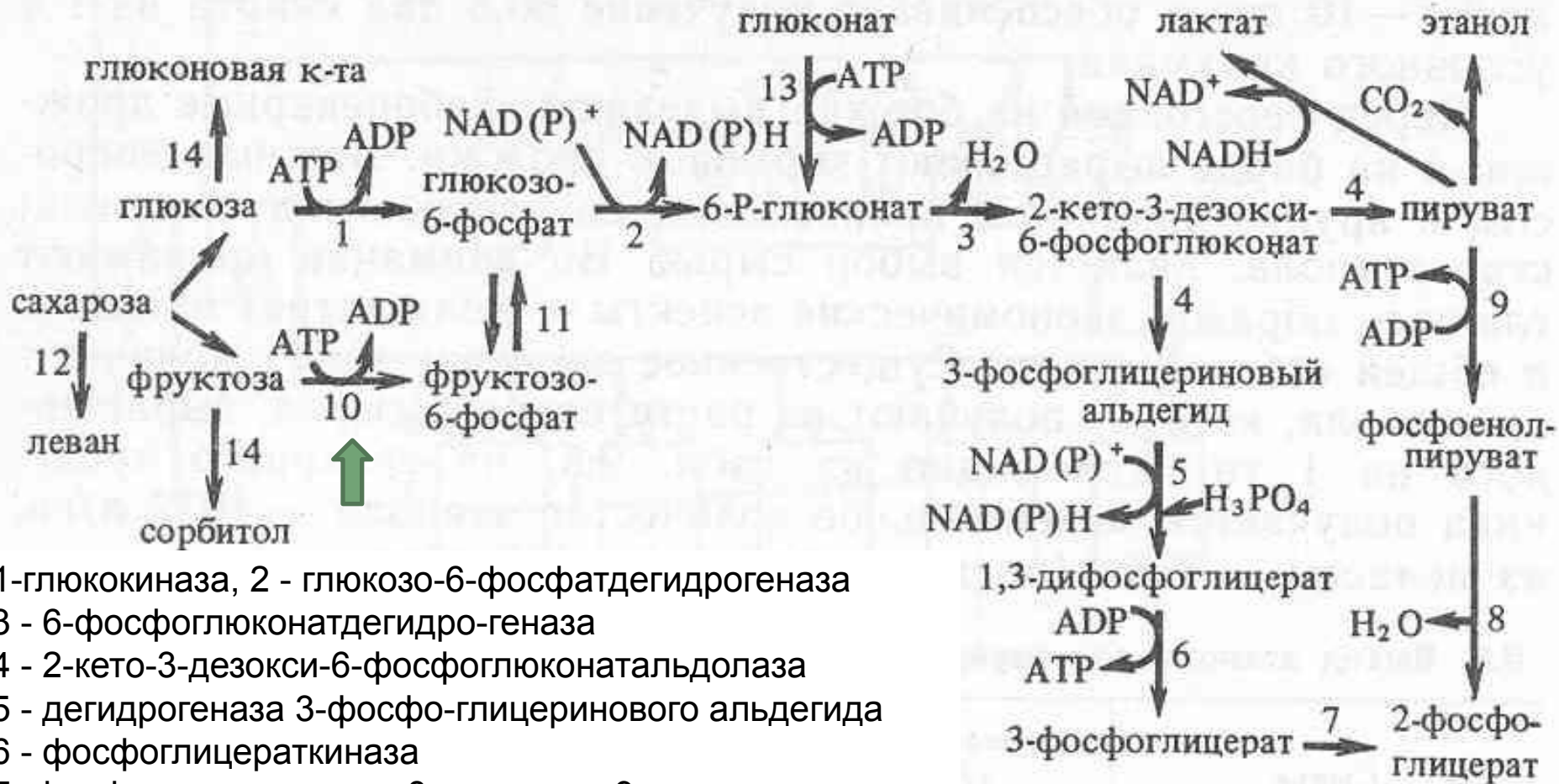
Изменяют скорость поглощения и утилизации субстрата клеткой

Изменяют уровень синтеза биосинтетических ферментов и активность регуляторных ферментов

Изменяют регуляцию дальнейшего внутриклеточного превращения продукта или его деградации

Изменяют способность к экскреции продукта из клетки





**Схема катаболизма у *Zymomonas mobilis***

- 1-глюкокиназа, 2 - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- 3 - 6-фосфоглюконатдегидрогеназа
- 4 - 2-кето-3-дезоксиглюконатальдолаза
- 5 - дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида
- 6 - фосфоглицераткиназа
- 7- фосфоглицеромутаза 8 - енолаза, 9 - пируваткиназа,
- 10 - фруктокиназа, 11 - фосфогексоизомераза
- 12 - левансахараза, 13 - глюконокиназа,
- 14 - глюкозофруктозотрансгидрогеназа

Мутанты бактерий *Zymomonas mobilis* с нарушенной функцией фермента фруктокиназы не ассимилируют фруктозу. После расщепления сахарозы на глюкозу и фруктозу мутанты ассимилируют только глюкозу, а фруктоза пассивно накапливается в среде.

# Биотехнологический процесс



**Стадии**



*I. Подготовительная стадия*



*II. Стадия культивирования*



*III. Стадия получения продукта*



# Основные этапы подготовительной стадии



## *I. Подготовительная стадия*

Выбор биообъекта (поиск диких форм, отбор наиболее перспективного материала для селекции)

Подготовка биообъекта к селекционной работе (получение генетически однородных и стабильных форм для эксперимента, стабилизация биообъектов по качественным и количественным

Селекция биообъектов (выбор метода селекции: мутагенез или рекомбиногенез, селекция биообъектов, отбор и стабилизация биообъектов по приобретенным свойствам)

Природный штамм  
микроорганизма



Выявление и отбор  
продуктивного  
стабильного штамма  
на основе естественной  
изменчивости



Обработка штамма  
мутагенами



Выявление и отбор  
перспективных мутантов



Многочесный пересев  
с контролем на образование  
требуемого продукта



Получение продуктивного  
штамма



Передача продуктивного  
штамма в промышленное  
производство



## Упрощенная схема селекции микроорганизмов

# Подготовительная стадия (объект селекции - микроорганизмы)



## 1. Выбор биообъекта

(поиск исходных «диких» структур, отбор наиболее перспективного материала для селекции)



# Выбор биообъекта для последующей селекции



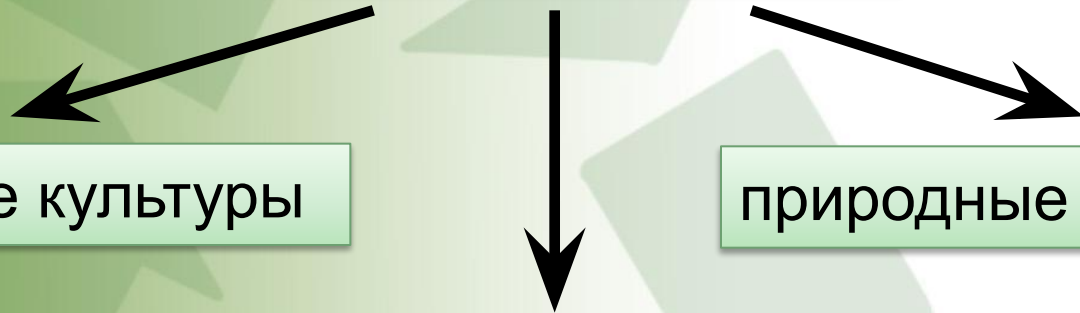
## *А) Поиск диких форм*

**ИСТОЧНИКИ**

музейные культуры

природные субстраты

известные промышленные  
производители



# Выбор биообъекта для последующей селекции



## Б) Отбор наиболее перспективного материала



# Подготовительная стадия (объект селекции - микроорганизмы)



**2. Подготовка биообъекта к селекционной работе  
(получение генетически однородных форм для последующей селекции, стабилизация биообъектов по качественным и количественным характеристикам)**





# Подготовка биообъекта к селекционной работе



P.Koch

## А) Получение «чистых культур»

Внесение в элективные питательные среды



Получение накопительных культур



Пересев на твердые питательные среды



Получение «чистых культур»

# Подготовка биообъекта к селекционной работе



## *Б) Стабилизация биообъектов*

**«Чистка культуры»** - выявление типичной морфологической формы и отклонений от нее. Оценка продуктивности, как основной морфологической формы, так и ее вариантов.



**«Ступенчатое клонирование»** - проверка стабильности выбранного клона по количественному признаку, то есть продуктивности.

# Подготовительная стадия (объект селекции - микроорганизмы)



**3. Селекция биообъектов** (выбор метода селекции: мутагенез или рекомбиногенез, селекция биообъектов, отбор и стабилизация биообъектов по приобретенным свойствам)



## **Микроорганизмы как объект селекции имеют ряд особенностей:**

**«-» Высокие темпы мутирования.** Генетическая однородность микробной колонии быстро нарушается (высокие темпы деления ↔ естественные мутации).

**«-» Гаплоидность** микроорганизмов ограничивает комбинативную изменчивость – основу селекции высших организмов.

**«+» Быстрая смена поколений** обеспечивает их перспективность при отборе положительных экземпляров и для быстрой оценки результатов селекционной работы.

## ***А) Выбор метода селекции***



**ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП**  
*организм несет признак*

ДА

НЕТ

***мутагенез***

***рекомбиногенез***

**СОВРЕМЕННЫЕ**



***МУТАГЕНЕЗ***

Мутагенез применяется для улучшения свойств, присущих данной живой системе, с применением прямых или непрямых мутагенов.

**Спонтанный**

**Индукцированный**



# Словарь



**Мутагенез** – процесс внесения изменений в структуру генома под действием мутагенных факторов

**Мутагены** – факторы, вызывающие повреждение структуры ДНК

**Мутации** – перестройки генетического материала

**Ауксотрофы** – микроорганизмы, утратившие способность синтезировать одно из веществ, необходимых для их роста (аминокислоту, витамин или др.).

# Мутагенные факторы



## Физические

температура,  
излучения  
быстрые  
электроны,  
протоны,  
нейтроны,  
 $\alpha$ -частицы,  
рентгеновские,  $\gamma$ -лучи  
ультразвук

## Химические

ингибиторы синтеза  
нуклеиновых кислот:  
*кофеин, азагуанидин,  
аминоурацил, аминопурин*  
аналоги азотистых  
оснований:  
*5-бром урацил, 5-хлор урацил*  
алкилирующие  
соединения:  
*формальдегид, фенол,  
диметилсульфат*  
супермутагены  
производные  
нитрозосоединений

## Биологические

бактериофаги,  
биотоксины  
грибов:  
*афлатоксин В1*  
экзогенная ДНК  
вирусы

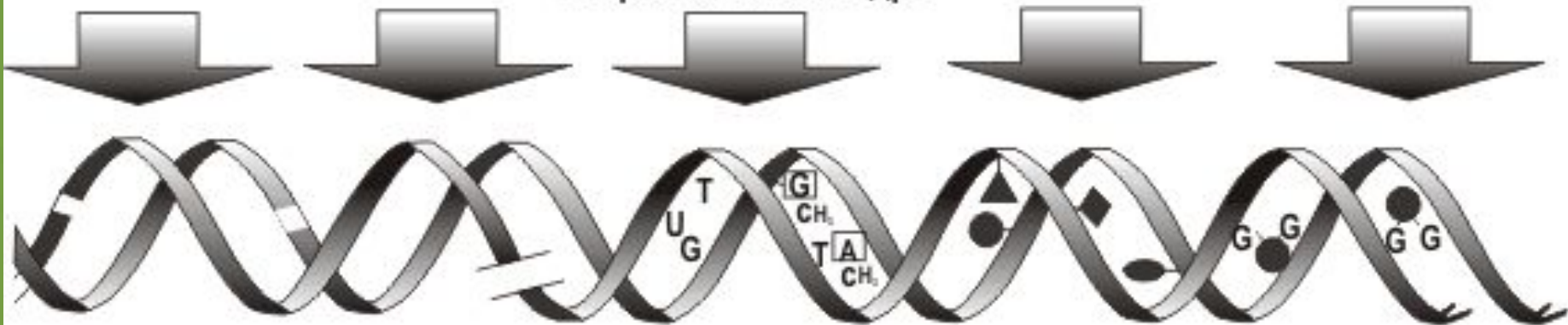


Активные формы кислорода  
перекиси, эпокисоединения,  
хиноны др.

Алкилирующие  
агенты, нитрозамины  
гетероциклические  
амины, этиленимины,  
хлорэтиламины и др.

ПАУ, афлатоксины В1,  
хлорпроизводные  
гетероциклических  
аминов

Хлорэтиламины,  
хлорамбуцил,  
производные  
платины и др.



АП-сайты

однонитиевые  
разрывы

модифицированные  
основания

аддукты

межнитевые  
"сшивки"

репарация  
апуриновых  
апиридиновых  
сайтов  
с помощью  
инсераз

восстановление  
фосфородиэфирных  
связей  
с помощью  
полинуклеотидлигазы

репарация  
оснований  
метил-  
трансферазами

нуклеотидная  
эксцизионная  
репарация

эксцизионная  
репарация  
оснований

репарация  
мисмэтчей

нуклеотидная  
эксцизионная  
репарация

нуклеотидная  
эксцизионная  
репарация

двунитиевые разрывы

гомологичная  
рекомбинация

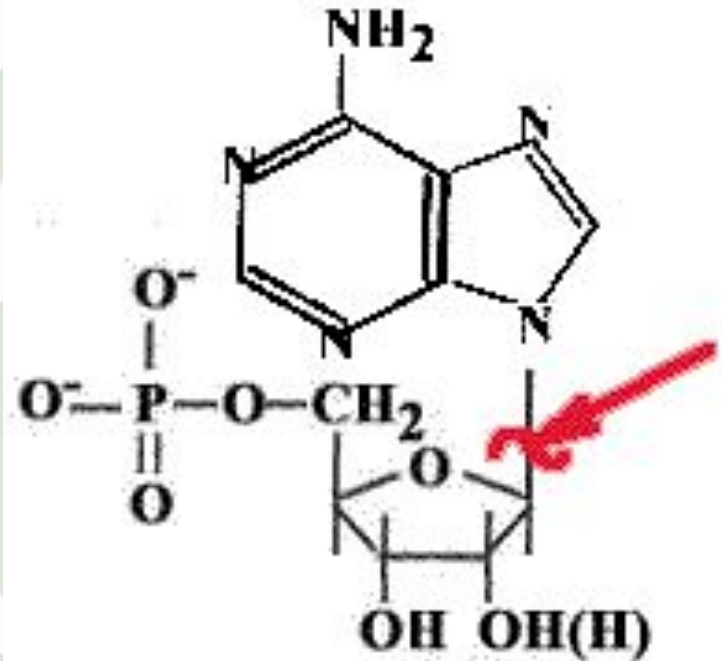
воссоединение  
негомологичных  
концов

# Механизмы индукции мутаций в ДНК



## 1. Апуринизация

Разрывается N-гликозидная связь между пуриновым основанием и дезоксирибозой.



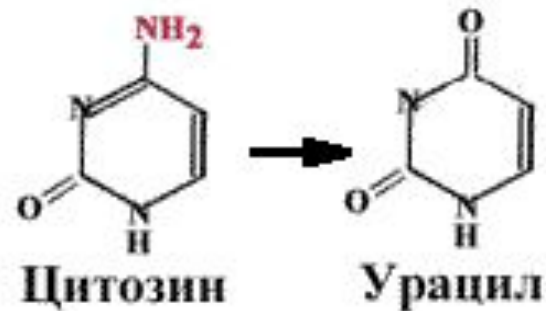
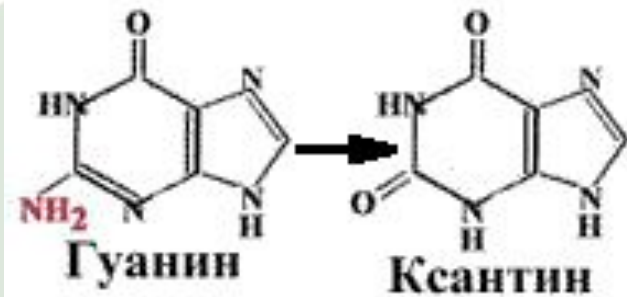
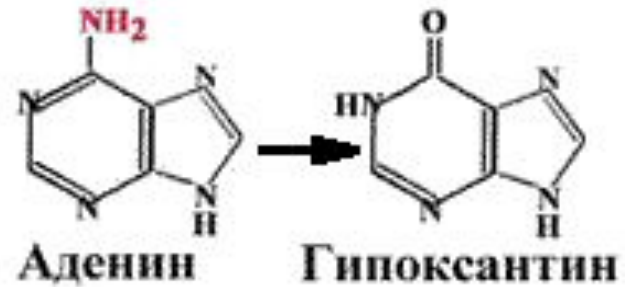
*Мутаген - температура*

# Механизмы индукции мутаций в ДНК



## 2. Дезаминирование

Аденин превращается в гипоксантин, который может связываться с цитозином.  
Гуанин превращается в ксантин, который связывается с тимином.  
Из цитозина образуется урацил.



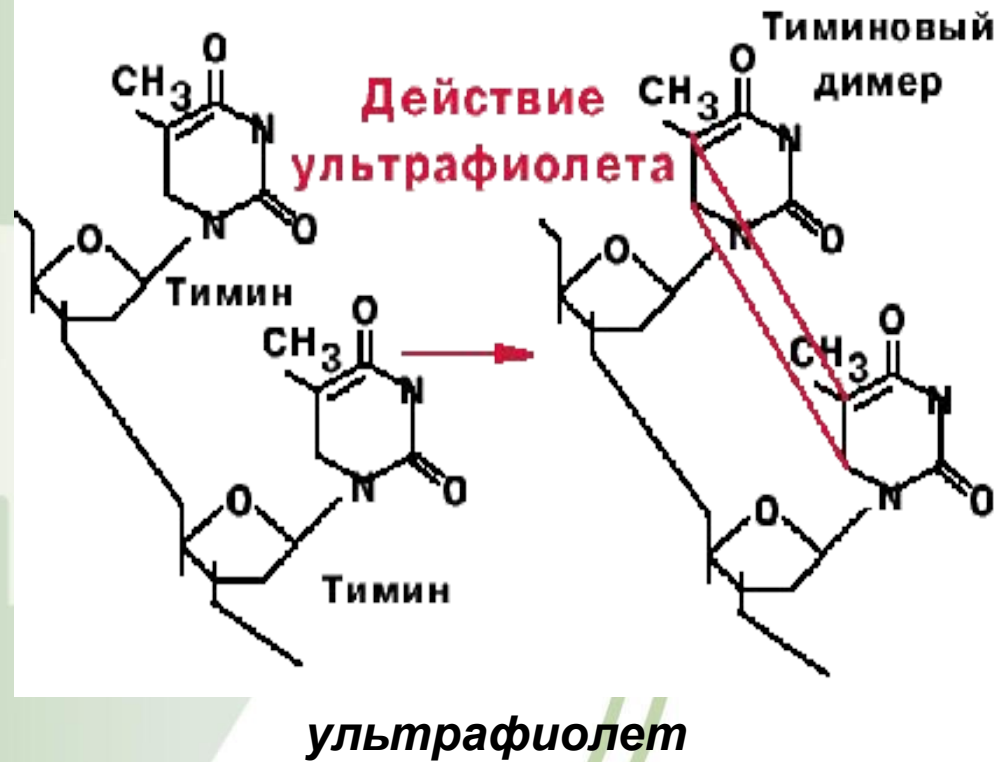
*Мутаген - излучения*

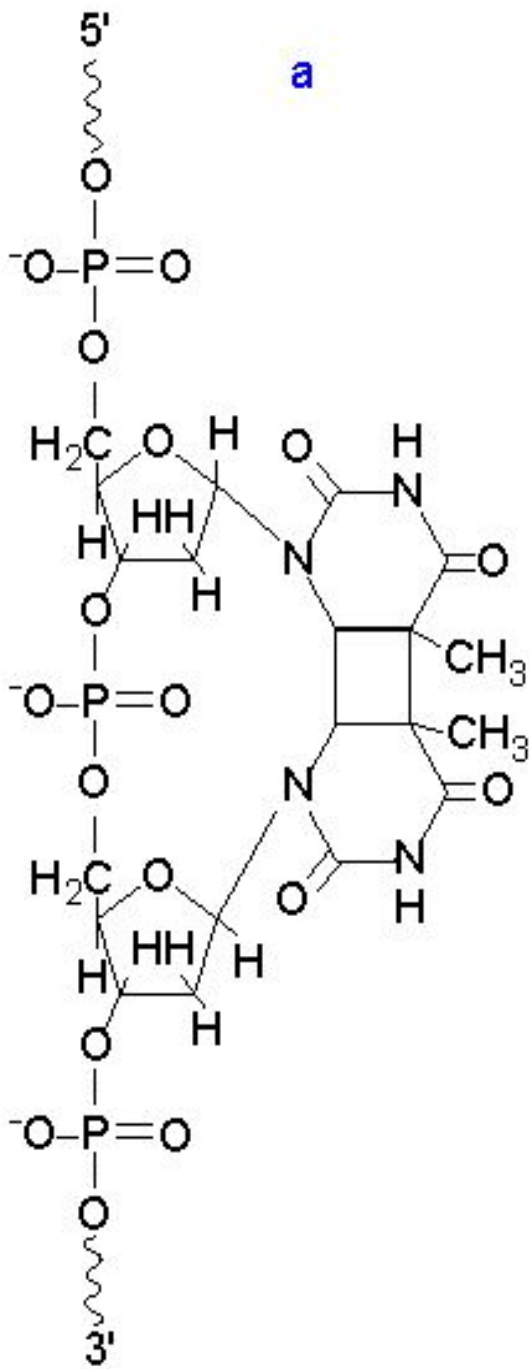
# Механизмы индукции мутаций в ДНК



## 3. Тиминовые димеры

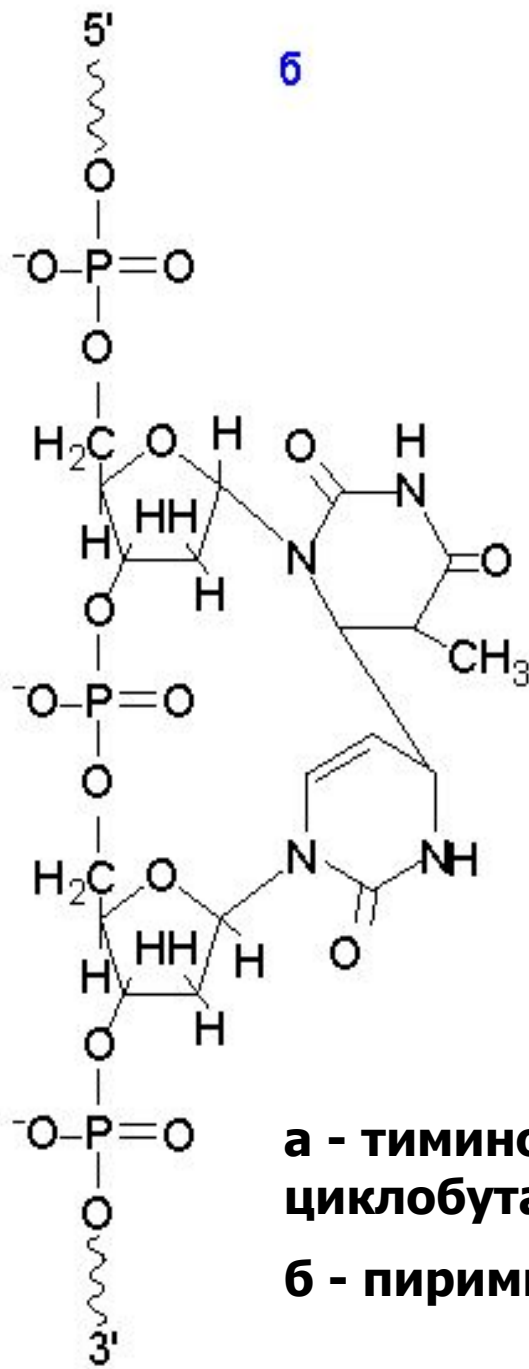
Сшиваются соседние пиримидины.  
Это блокирует репликацию.





**T**

**T**



**T**

**C**

**а - тиминовый димер  
циклобутанового типа**

**б - пиримидиновый димер**



# Для эффективной индукции мутаций необходимо учитывать:



- характер биологического материала
- характер мутагенного воздействия
- способ прекращения мутагенного воздействия
- дозу мутагенного воздействия

# Методы отбора мутантов



## Скрининг

**Проводят количественную оценку нового признака/ свойства тотально у всех подвергнутых мутагенному воздействию организмов.**

## Отбор по фенотипу

**При отборе учитывают фенотипические особенности организма, возникающие под действием мутации: ауксотрофность, резистентность и др.**