

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 увеличение 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)	Скрещивание 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: а) неродственная (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

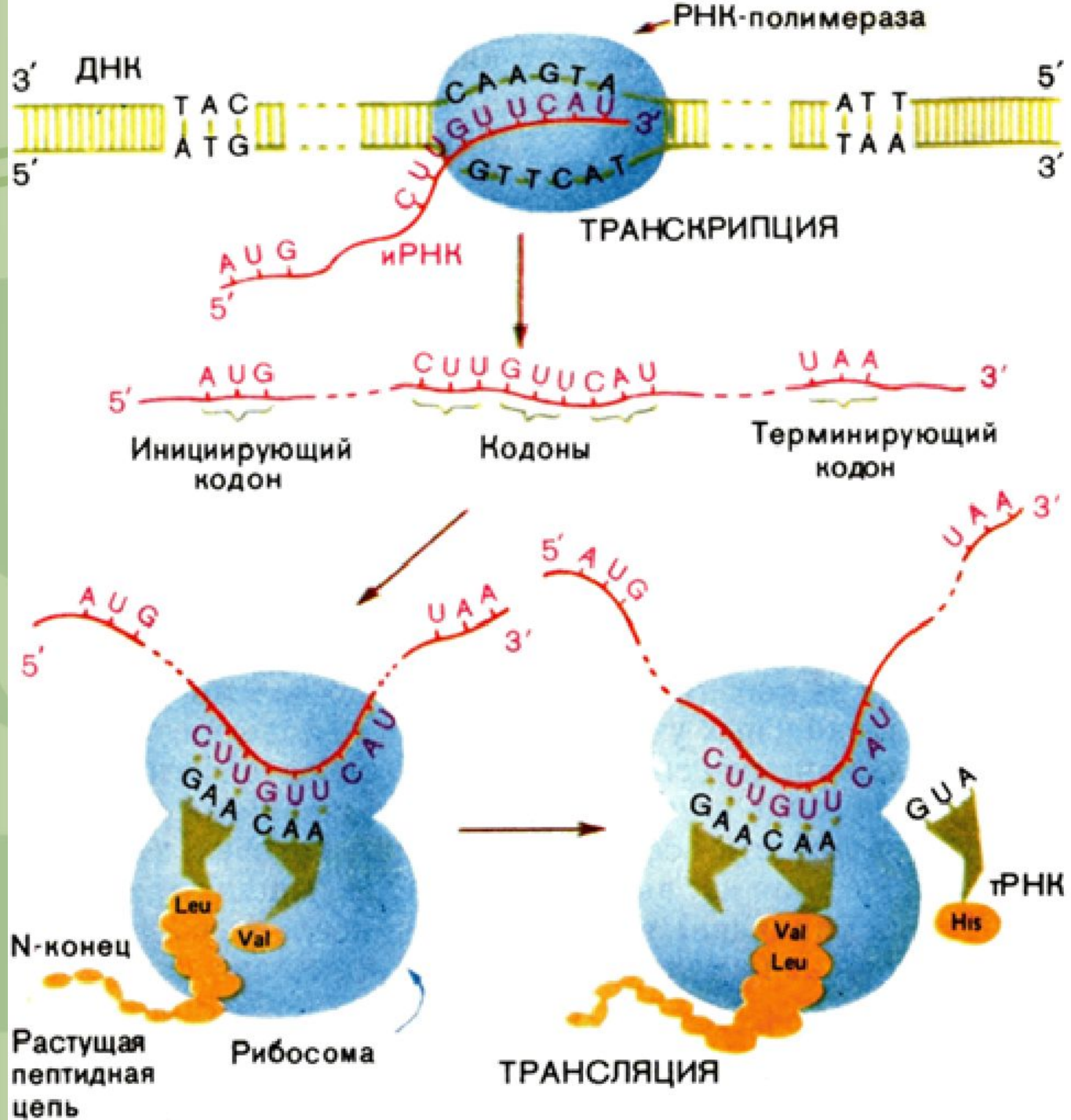
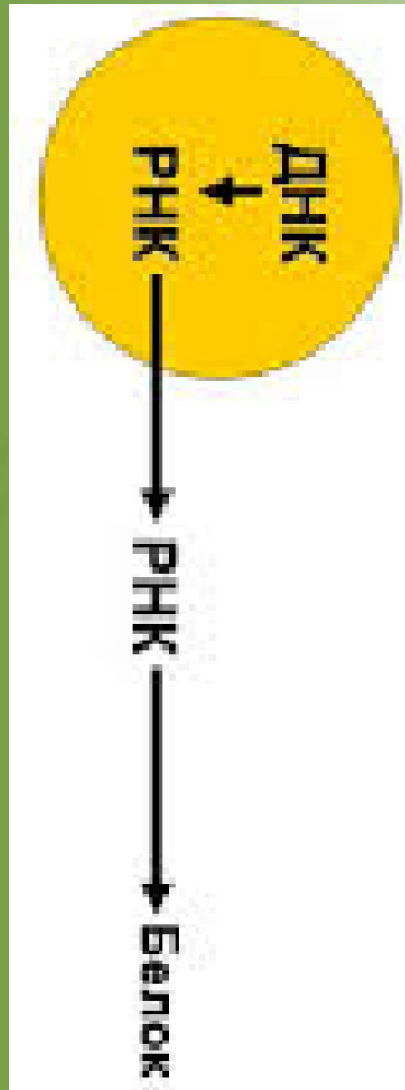
МУТАГЕНЕЗ В СЕЛЕКЦИИ

Словарь



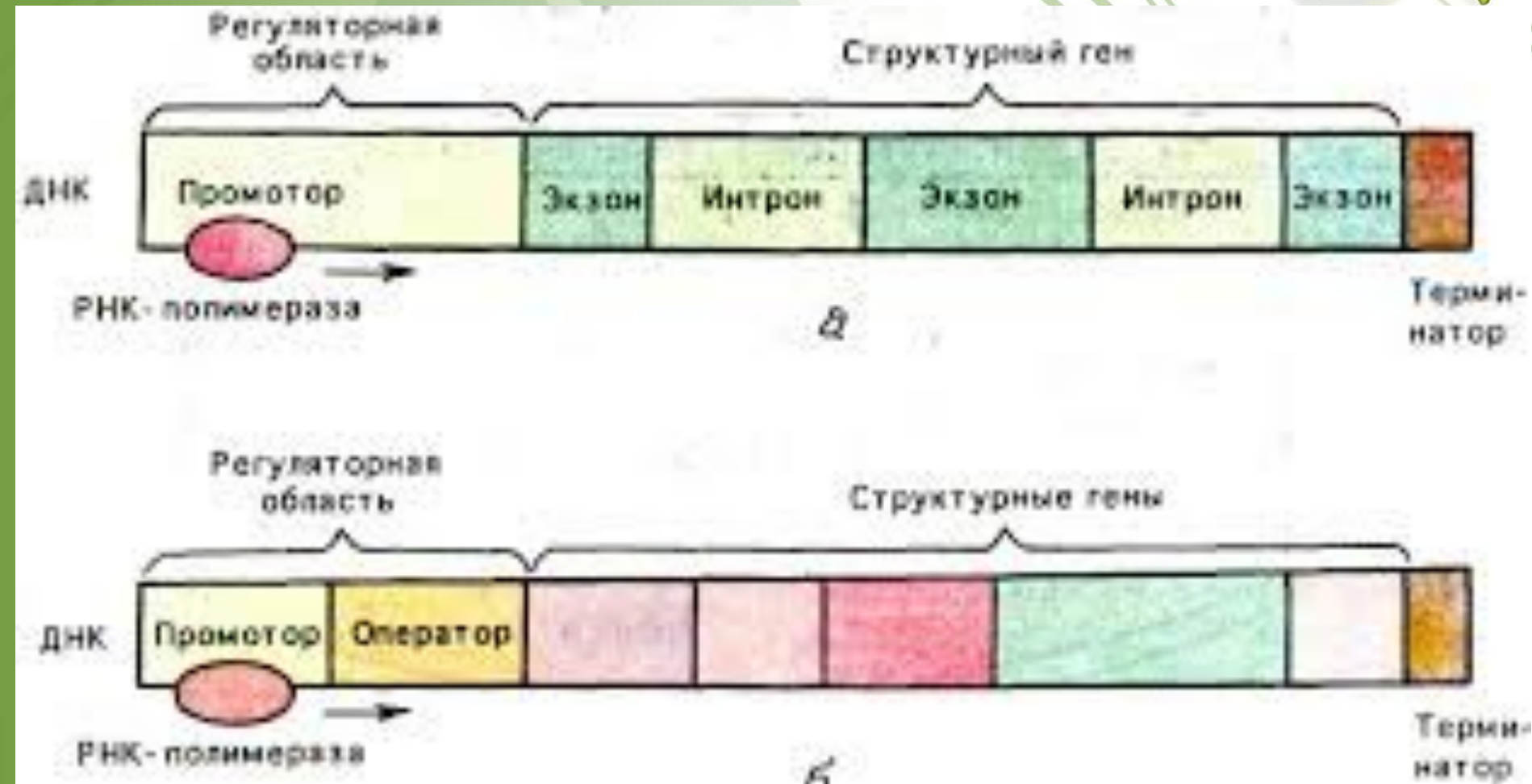
Структурные (кодирующие) **гены** – несут информацию о белках и последовательности нуклеотидов в РНК

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

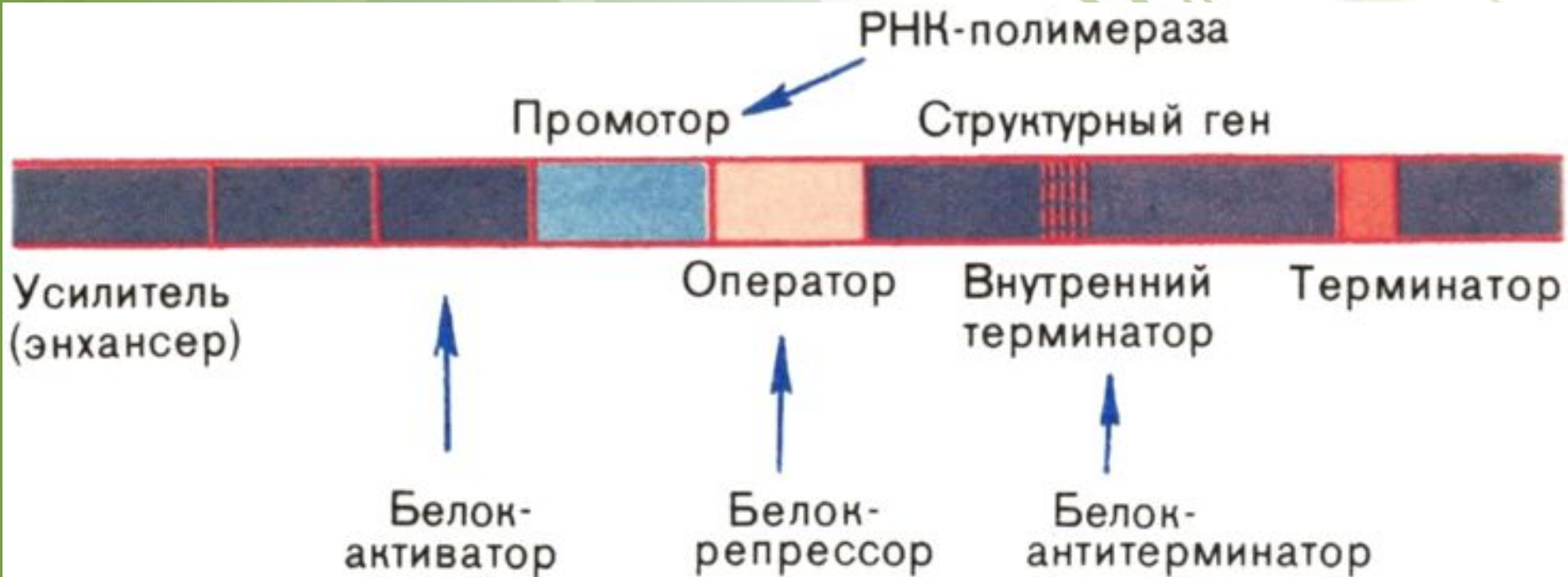


Структурные
гены

Транскриптоны



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



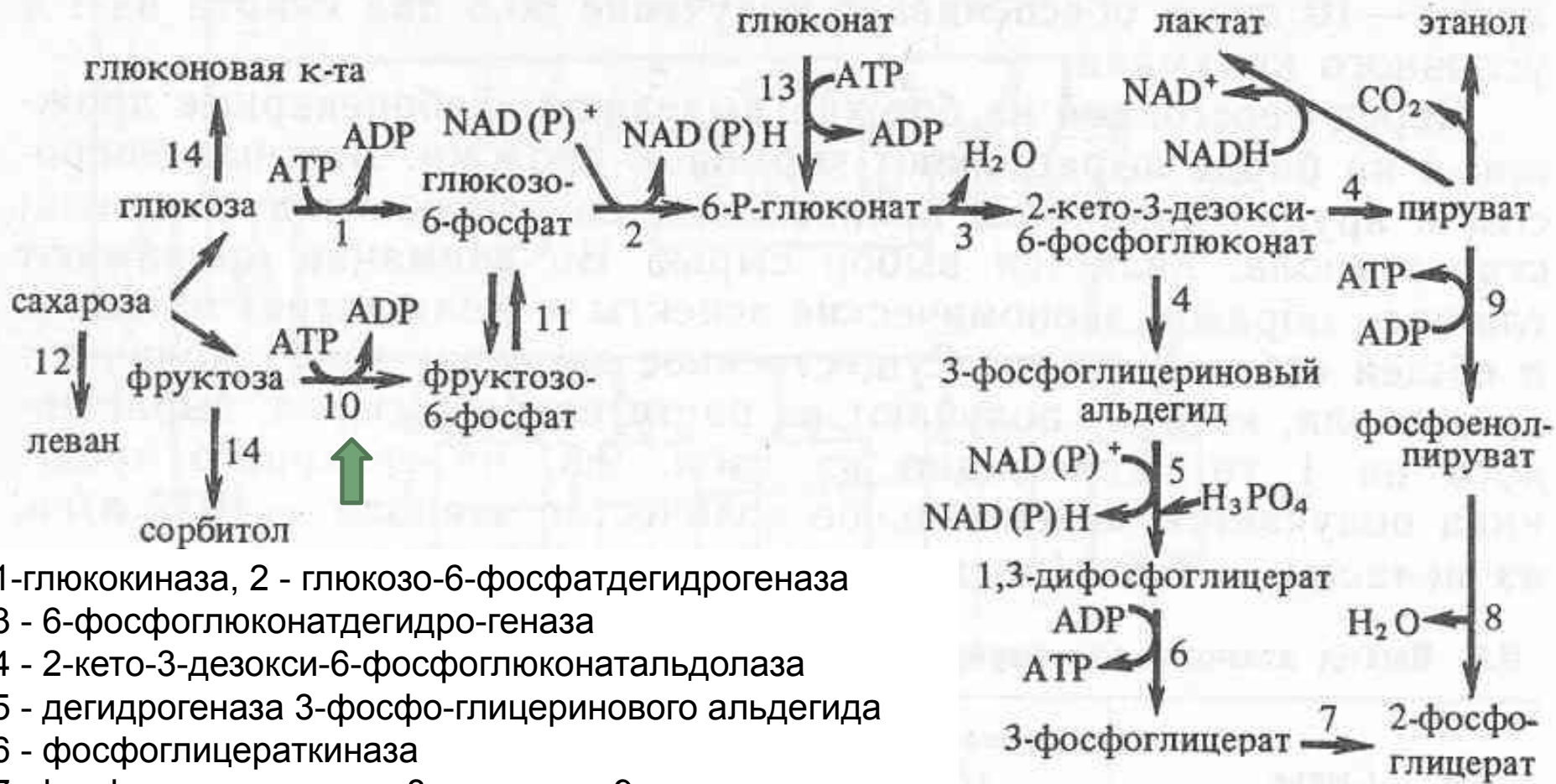


Схема катаболизма у *Zymomonas mobilis*

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



I. Подготовительная стадия



II. Стадия культивирования



III. Стадия получения продукта



Стадии

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



Многократный 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)**



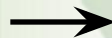
Подготовка биообъекта к селекционной работе



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,
 α -частицы,
рентгеновские, γ -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

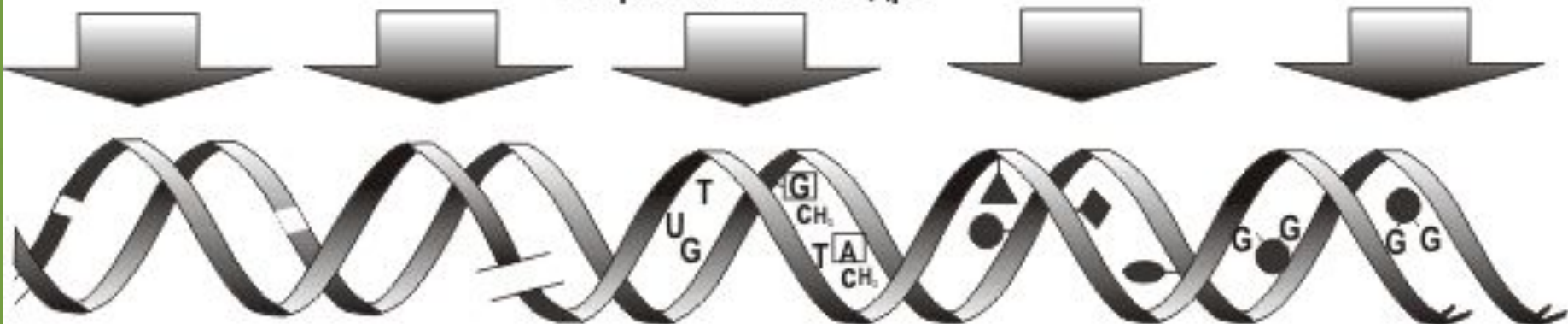
бактериофаги,
биотоксины
грибов:
афлатоксин В1
экзогенная ДНК
вирусы

Активные формы кислорода
перекиси,эпоксисоединения,
хиноны др.

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

ПАУ,афлатоксиныВ1,
хлорпроизводные
гетероциклических
аминов

Хлорэтиламины,
хлорамбуцил,
производные
платины и др.



АП-сайты

однонитиевые
разрывы

модифицированные
основания

аддукты

межнитевые
"сшивки"

репарация
апуриновых
апиримидиновых
сайтов
с помощью
инсераз

восстановление
фосфородиэфирных
связей
с помощью
полинуклеотидлигазы

репарация
оснований
метил-
трансферазами

нуклеотидная
эксцизионная
репарация

репарация
мисмэтчей

эксцизионная
репарация
оснований

нуклеотидная
эксцизионная
репарация

нуклеотидная
эксцизионная
репарация

двунитиевые разрывы

гомологичная
рекомбинация

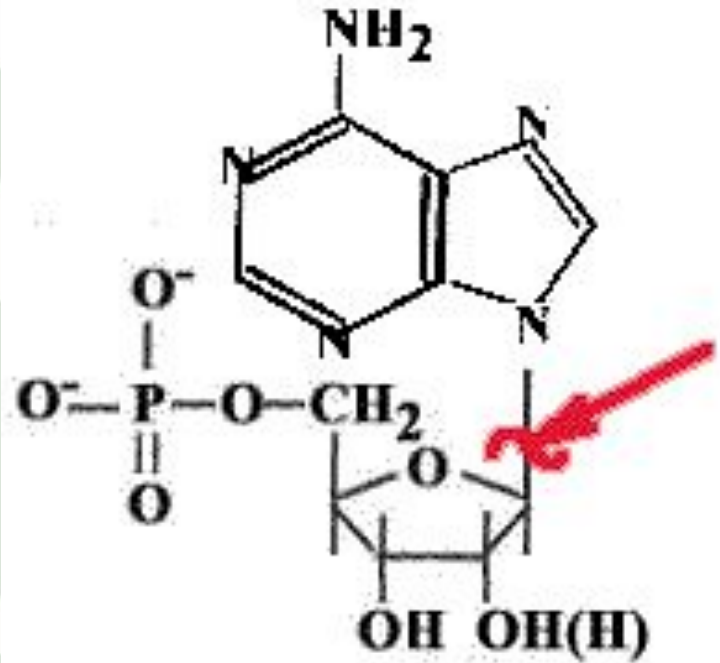
воссоединение
негомологичных
концов

Механизмы индукции мутаций в ДНК



1. Апуринизация

Разрывается N-гликозидная связь между пуриновым основанием и дезоксирибозой.



Мутаген - температура

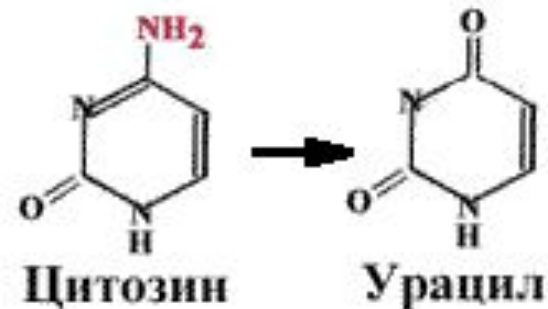
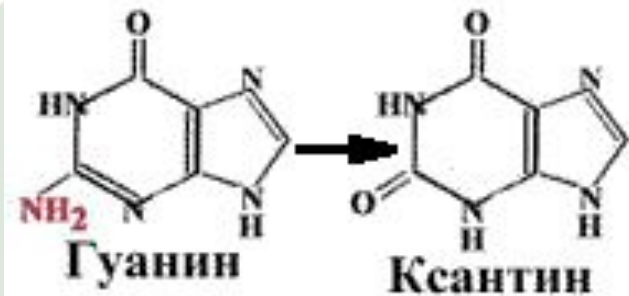
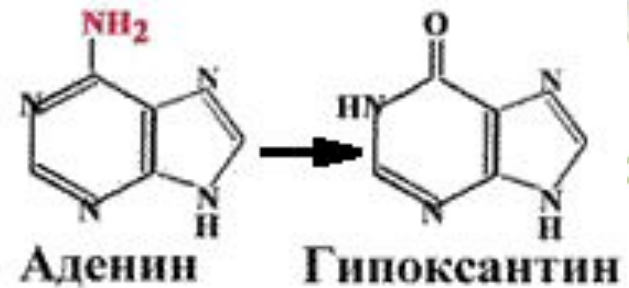
Механизмы индукции мутаций в ДНК



2. Дезаминирование

Аденин превращается в **гипоксантин**, который может связываться с цитозином.

Гуанин превращается в **ксантин**, который связывается с тиминам.
Из **цитозина** образуется **урацил**.



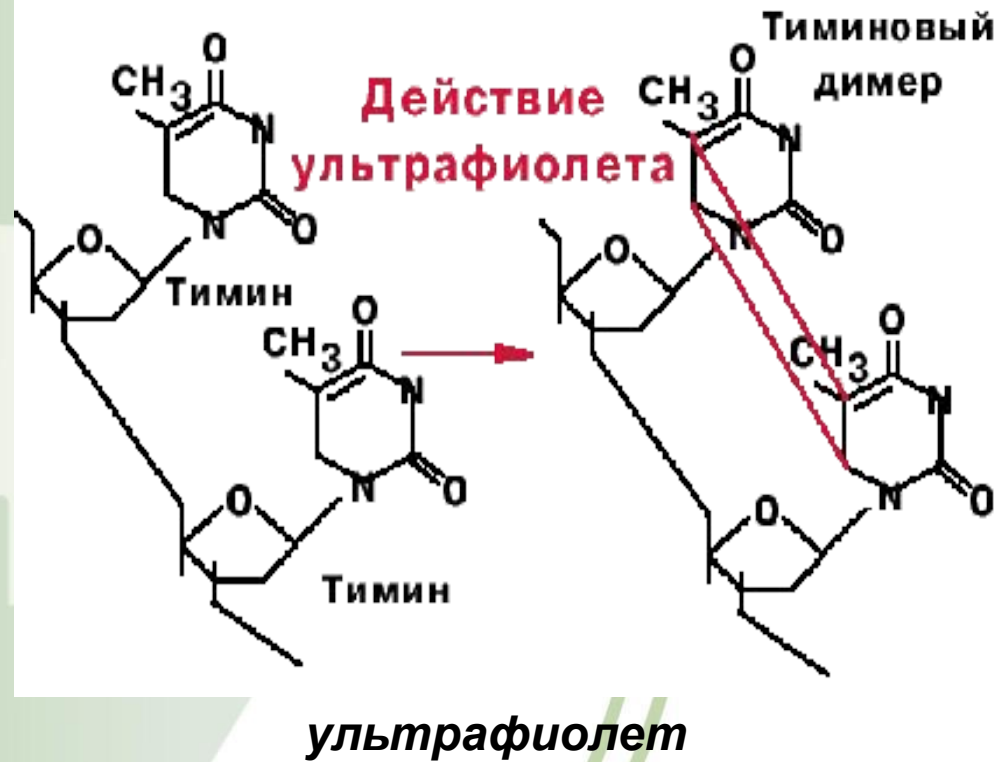
Мутаген - излучения

Механизмы индукции мутаций в ДНК

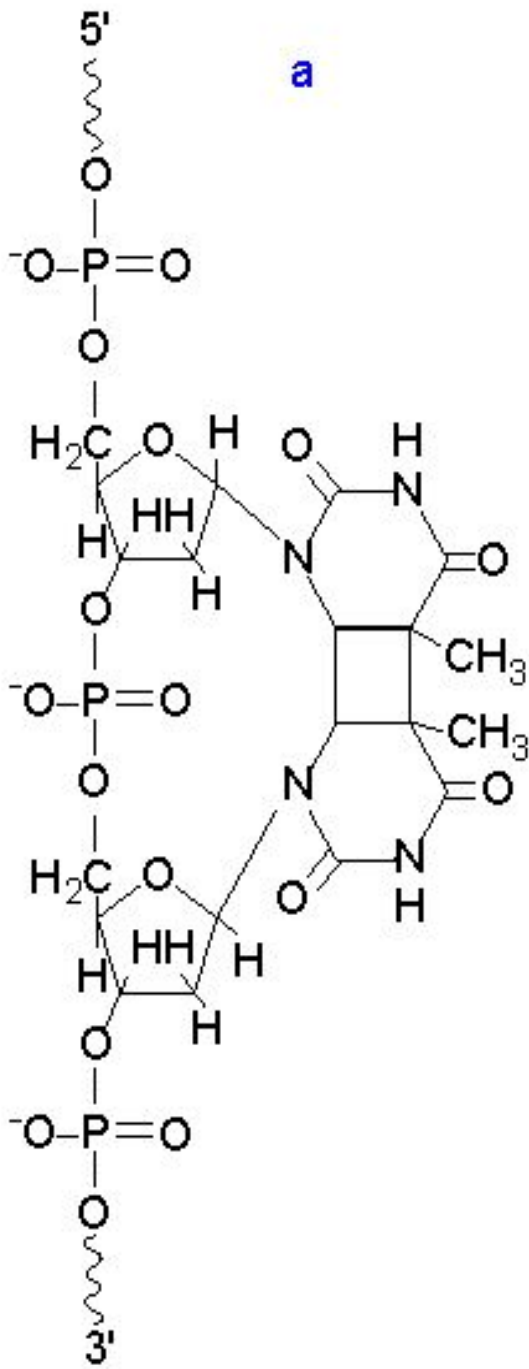


3. Тиминовые димеры

Сшиваются соседние
пиримидины.
Это блокирует репликацию.



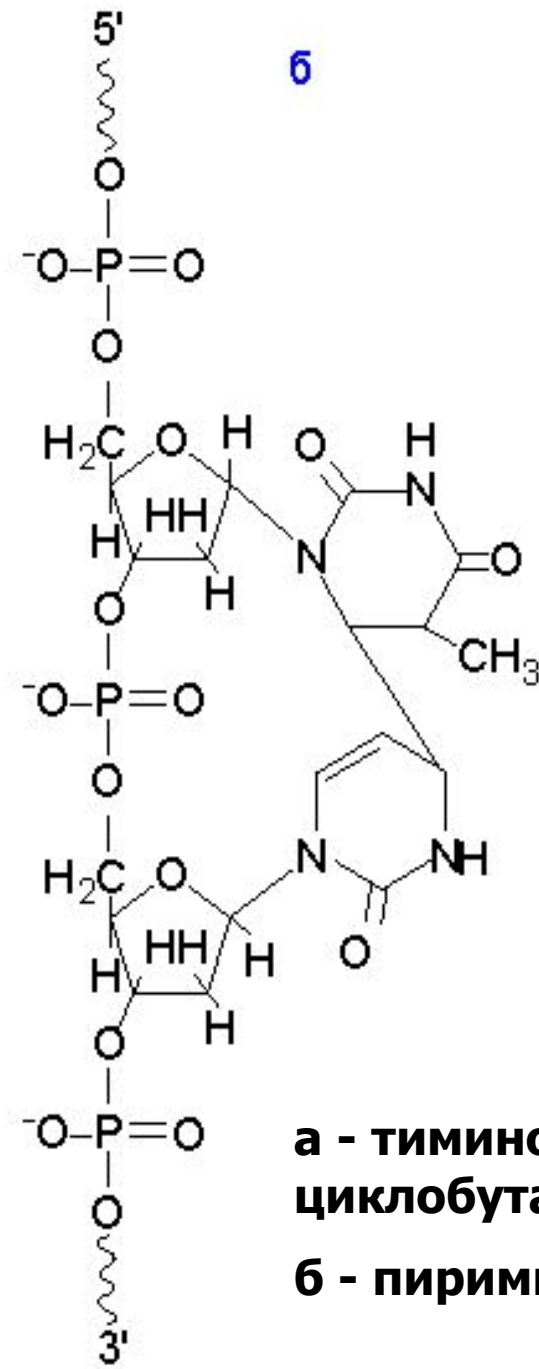
a



T

T

b



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.