



**Биотехнология  
в селекции растений  
Часть 7.  
Селекция на качество  
продукции**



Показатели высокого качества зависят от **направления селекции**

Для **продовольственного ячменя** – хорошее качество крупы (разваримость, вкусовые качества, питательная ценность, высокое содержание белка и лизина в белке)

Для **пивоваренного ячменя** – высокая способность к прорастанию, хорошая экстрактивность солода, низкая пленчатость, низкое содержание белка

Качество может быть принесено в жертву только при необходимости резкого увеличения производства продукта

**Компромисс между технологичностью и качеством**

Низкая урожайность **высоколизиновых гибридов** кукурузы и сортов ячменя

**Овощные, плодовые, ягодные** – вкус за счет урожайности

**Декоративные культуры** – всё ради качества и внешнего вида

**Качественные показатели** – поведение продукции сорта при переработке и качество конечного продукта  
При переработке качество оценивается на каждой ступени

**Помол** – легкость помола и высокий выход муки;  
**приготовление теста** – легкость замеса, стойкость теста

**Пивоварение** – способность к дружному и быстрому прорастанию, экстрактивность солода

**Получение пряжи** – выход трепленного волокна из

**Дегустационные характеристики**  
**Питательная ценность (калорийность)**  
**Содержание ценных для здоровья веществ**

**Группы сортов:**

**Мягкая пшеница** – сильные ( более 15 % белка, 26 % клейковины, может улучшать слабые пшеницы) и ценные (дают хороший хлеб, но не улучшают слабые)

**Ячмень** – пивоваренные сорта

**Люпин** – безалкалоидные сорта

**Рапс** – безэруковые сорта

**Исходный материал** – селекционные сорта, полученные из сортов народной селекции

Старорусские сорта пшениц, сорт яблони Антоновка, Коричное полосатое, репа Петровская 1, лук Мячковский 300, Стригуновский

## **Признаки качества чаще полигенны**

**Олигогенны:** высокое содержание лизина

Эфиопский сорт Хайпроли, ген *lys* 4,6 % лизина (при 2,2-2,5 у обычных сортов)

Ген **o2** – повышение лизина в зерне кукурузы в 1,5-1,8 раза

Этот же признак может быть полигенным

## **Внутривидовая гибридизация**

**Мутагенез** (высоколизиновые мутанты ячменя серии Ризо, безалкалоидный люпин, мутант вики с пониженным содержанием ингибиторов пищеварительных ферментов, мутант подсолнечника с высоким содержанием олеиновой кислоты в масле)

Определение качественных показателей связано с **уничтожением семян**

Отбор в питомниках **испытания потомств** отобранных растений

При отборе элит можно оценивать **качества, не связанные с семенами**: содержание волокна льна, его гибкость и крепость, сахаристость сахарной свеклы, каннабиноидность клещевины, масличность подсолнечника (ЯМР)

У плодовых нужно ждать **плодоношения**

**Органолептические** оценки вкуса, цвета, запаха

**Технологические** оценки

**Определение содержания** различных веществ химическим и другими методами

**Биологические методы** при оценке кормовой ценности

## Цель оцен

У пшеницы при селекции на хл  
**качества**

Оценка качества муки – косвен  
седиментации

Количество и качество клейков

Качество теста на фаринографе

Сила муки на альвеографе

Выпечка



Широкое использование **косвенных оценок**

**Содержание крахмала** в картофеле по удельной  
массе, **хлебопекарные качества** – методом  
седиментации

Оценки в **абсолютных величинах** (масса 1000 зерен,  
натура), **баллах** (например, при дегустации), % или  
**мг%** (содержание ценных веществ)

**У злаков** наибольший интерес представляют белки эндосперма

**Запасные белки** кодируются генами, объединяемыми в мультигенные семейства

У бобовых **легумины** – низкий уровень метионина

У злаков **проламины** бедны лизином, триптофаном и треонином

Гены аминокислотного состава часто сцеплены и наследуются с генами, вызывающими нежелательные признаки:

Опейк-2, хайпроли (высокое содержание лизина) – корреляция с уменьшением синтеза основных запасных белков зеина и гордеина, снижением продуктивности и урожайности

# Запасные белки эндосперма

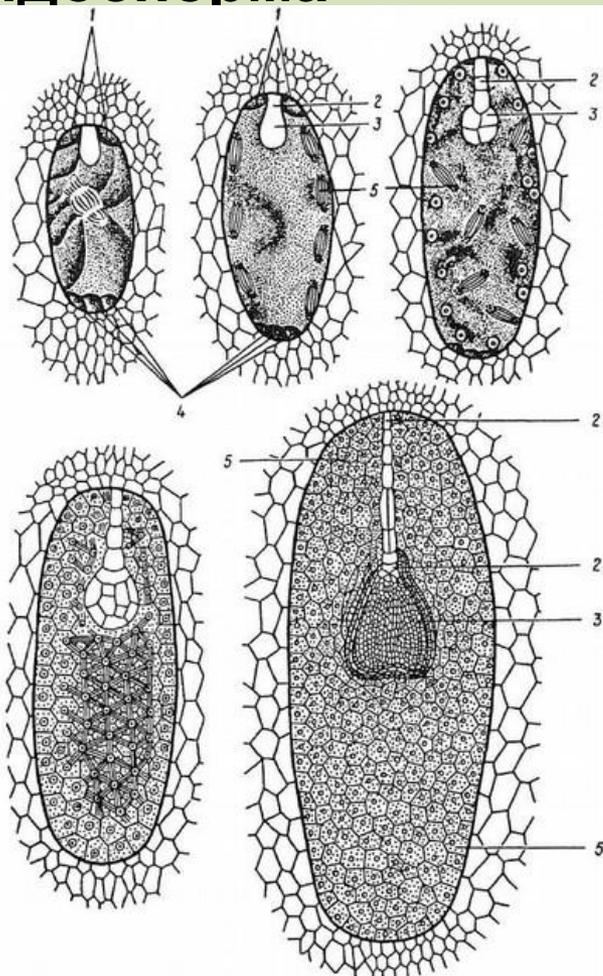
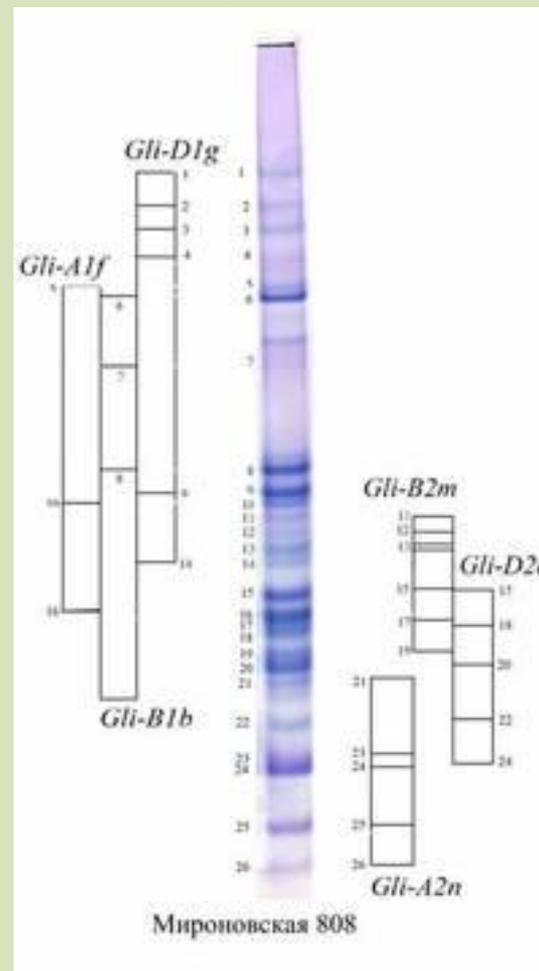
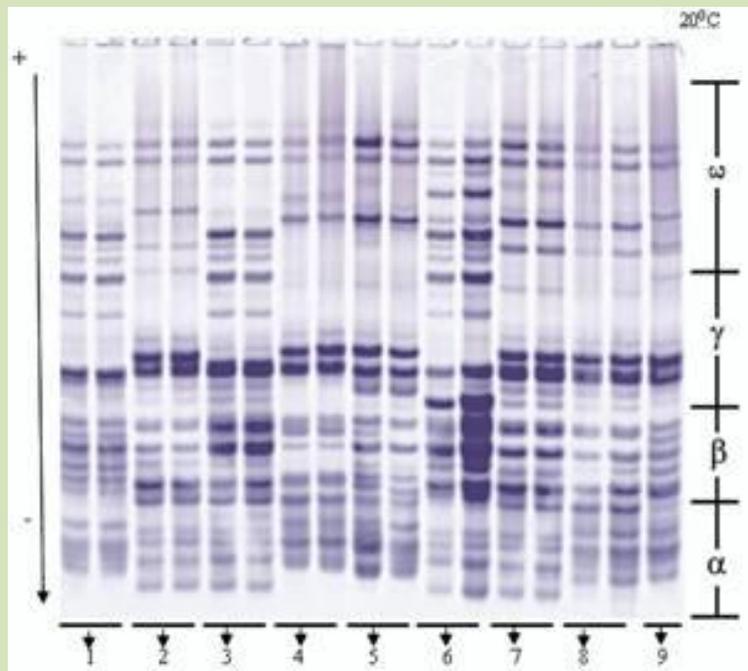
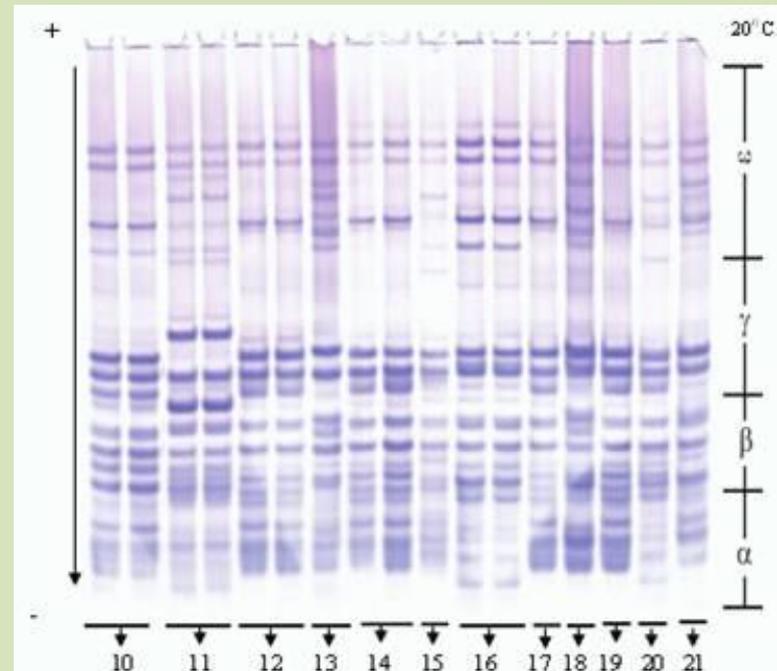


Схема последовательного развития зародыша и эндосперма у двудольных:  
 1 — синергиды; 2 — подвесок; 3 — зародыш; 4 — антиподы; 5 — эндосперм





**Рис.** Электрофореграммы глидинокодирующих локусов мягкой пшеницы  
 1 - Экинчи-84, 2 - Гобустан, 3 - Нурлу-99, 4 - Гырмызыгул, 5 - Безостая (st),  
 6 - Эзаметли- 95, 7- Анза, 8 - Рузи- 84, 9 - Саратовская-29



**Рис.** Электрофореграммы запасных белков глиадина в сортах мягкой пшеницы  
 10 - Дагдаш, 11 - Дурдана, 12 - Бирлик, 13 - Болбугда, 14 - Безостая (st), 15 - Бейаз,  
 16 - Анза (marker), 17 - Достлуг, 18 - Парзиван-1, 19 - Парзиван-2, 20 - Шеки-1, 21 - Шефер

## **Технология генно-инженерного улучшения качества:**

1. Клонирование генов запасных белков
2. Изучение механизмов экспрессии
3. Изменение последовательности генов
4. Создание векторов
5. Введение модифицированных генов в растение
6. Тестирование экспрессии генов и качества продукции

### **Общий план изолирования генов запасных белков:**

1. Получение и частичная очитска соответствующей мРНК
2. Синтез и клонирование кДНК
3. Выделение из геномных библиотек последовательности гена запасного белка

Общим для большинства генов запасных белков является **отсутствие интронов**

На расстоянии 300 п.н. от точки начала транскрипции расположена специфическая последовательность 25 п.н. – **эндосперм-бокс** – от него зависит

тканеспецифичность экспрессии в эндосперме

**Продукт любого гена**, перед которым есть этот бокс, будет продуцироваться в семенах или зернах.

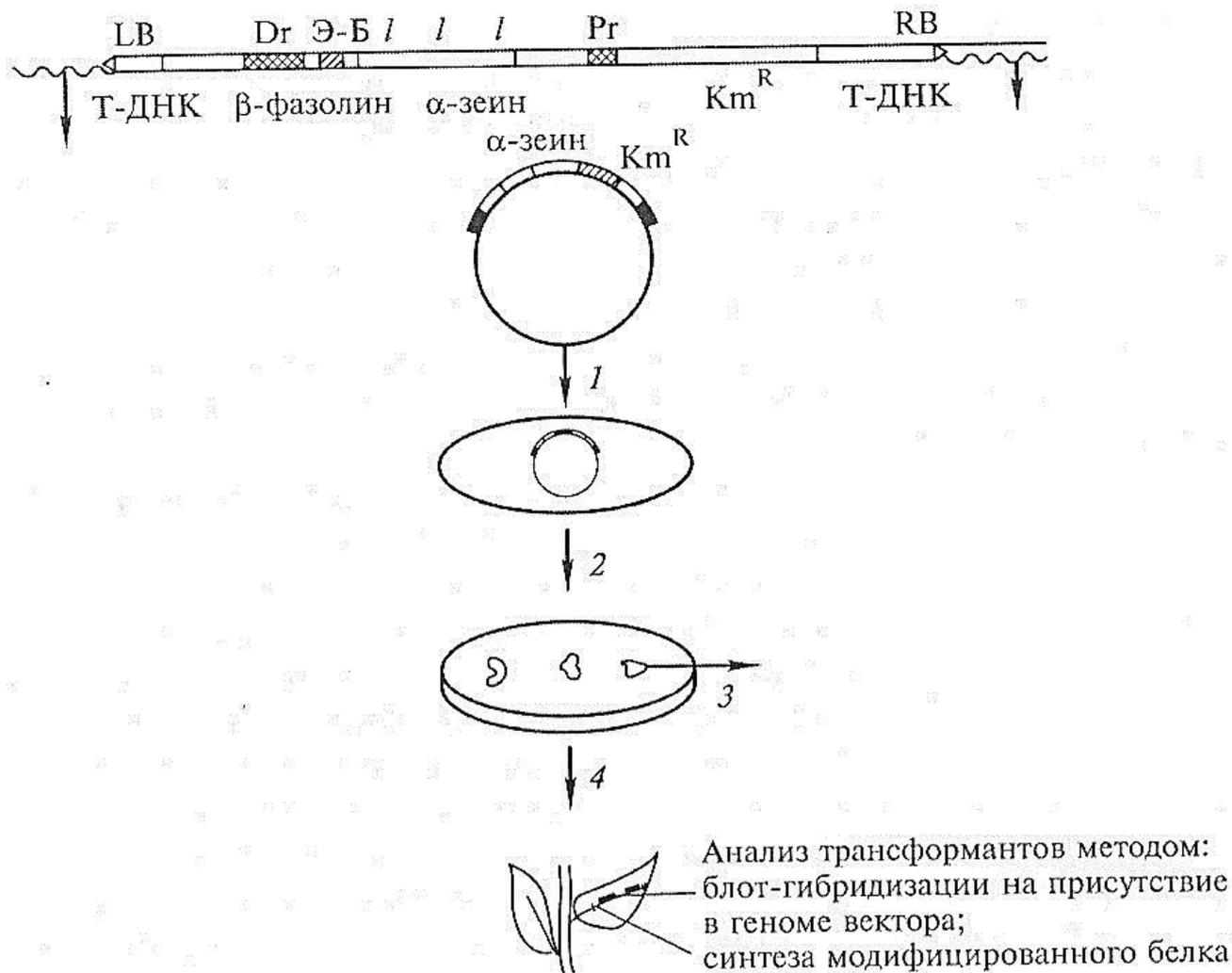
**$\alpha$ -зеин кукурузы** – низкое содержание лизина

С помощью **олигонуклеотид-направленного**

**мутагеза** ввели дополнительные **кодона лизина**

**Модифицированный ген  $\alpha$ -зеина** клонировали в T-ДНК вектора для трансформации + **эндосперм-бокс**

Получены **трансгенные растения**, синтезировавшие в семенах модифицированный белок.



**Рис. 2.5.** Схема получения трансгенного растения табака с интегрированным геном  $\alpha$ -зеина, обогащенного лизиновыми кодонами:

1 — трансформация агробактерии; 2 — трансформация растительных клеток; 3 — селекция на среде с антибиотиком канамицином; 4 — регенерация

## **Трансгенные растения пшеницы:**

Модифицированный ген высокомолекулярной субъединицы глютеина

Улучшение хлебопекарного качества пшеничной муки

**Конструирование химерных генов** на основе известной последовательности генов запасных белков одно- и двудольных.

Гены гордеина И1 ячменя и легумина И4 бобов

Получены трансгенные растения табака

## **«Съедобные вакцины»**

Растения табака и картофеля, синтезирующие иммуноглобулин А-Г, энтеротоксин, В-токсин холеры, белок поверхностного антигена гепатита В.

Свойства аналогичны свойствам белков животного происхождения.



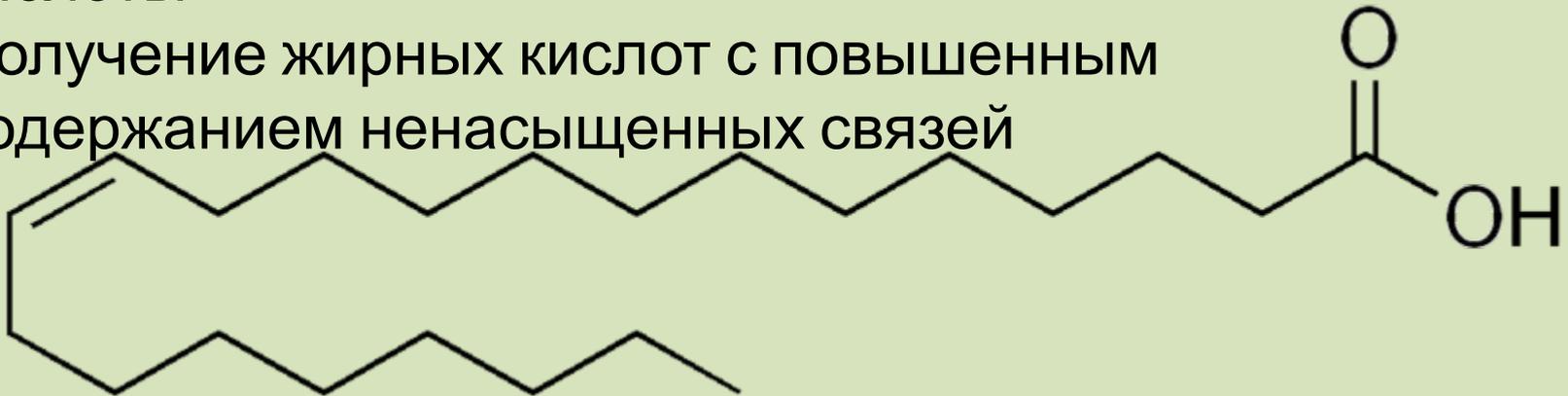
## Улучшение состава жирных кислот



Семена рапса – длинноцепочечная эруковая кислота,  
глюкозинолаты – резкое снижение вкусовых и  
питательных качеств рапсового масла

Получены сорта рапса с генами контроля длины  
молекул жирных кислот, снижение доли эруковой  
кислоты

Получение жирных кислот с повышенным  
содержанием ненасыщенных связей



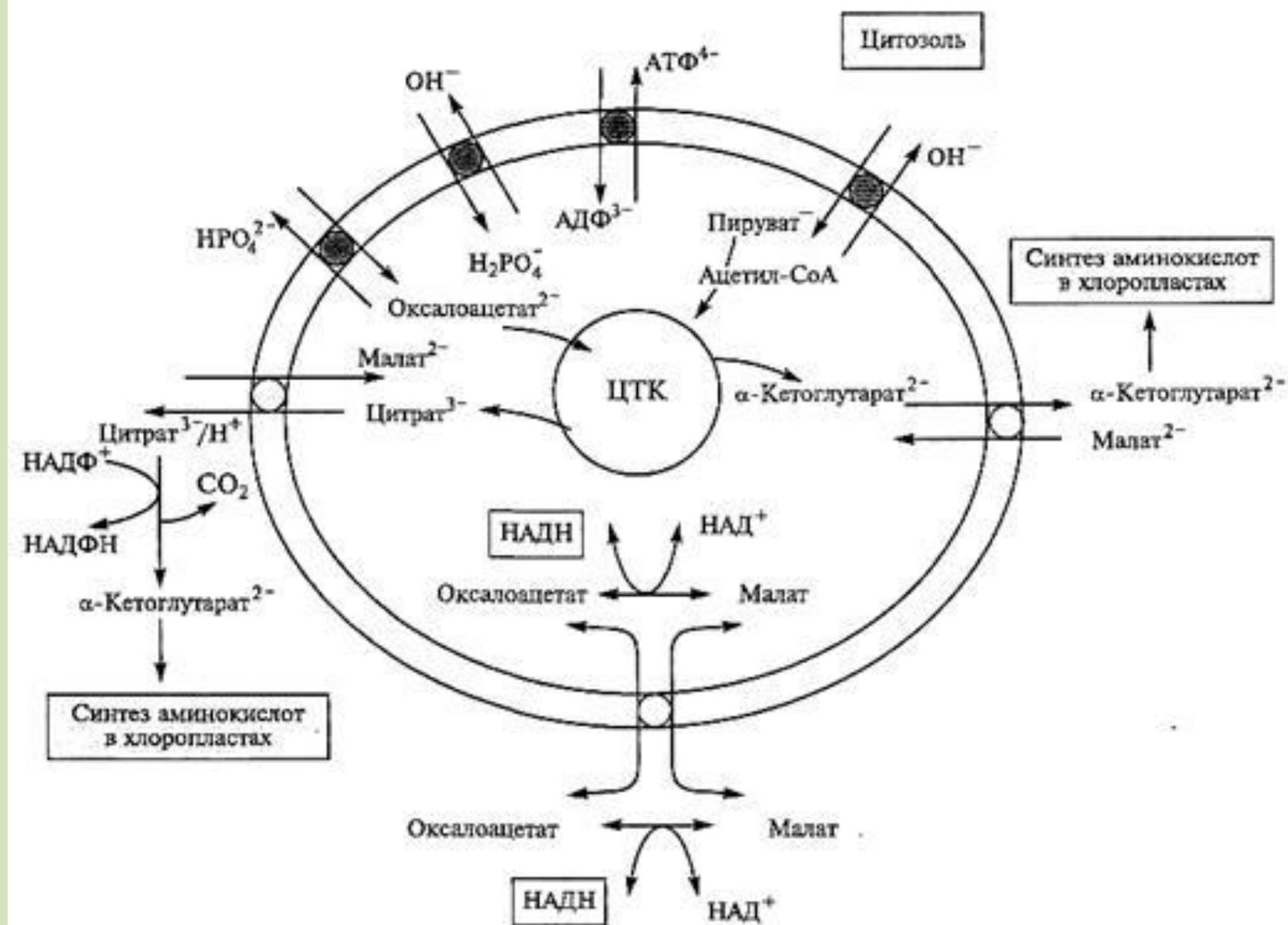
## **Изменение метаболизма у трансгенных растений**

Введение гена сахарозофосфатсинтетазы (ключевого фермента регуляции углеводного метаболизма) привело к изменению углеводного обмена и повышению продуктивности.

**Томат, картофель, рапс, хлопчатник**

Коммерческие сорта **гвоздики** с геном АСС-синтетазы, вызывающим ускоренное цветение, два сорта гвоздики и один сорт хризантемы с измененными генами биосинтеза антоциана – нетрадиционная окраска венчика

Сорта **петунии** и **львиного зева** с мобильными элементами



# Получение трансгенных растений, экспрессирующих белки для медицинских целей

## Преимущества:

**Экспрессия** в растениях гораздо дешевле, чем в биореакторах с животными клетками

Большая **безопасность** рекомбинантных белков в растениях, чем в животных, так как в растениях не развиваются патогенные для человека организмы

## **Посттрансляционные изменения белков**

(образование третичной структуры) более корректны, чем в прокариотических бактериях

**Наработка белков** в съедобных частях растения снижает цену продукта из-за отсутствия проблем с очисткой

1989 – трансгенные растения табака,  
экспрессирующие **иммуноглобулины IgG1**

**Соматотропин** (табак),  
**антитела** против вируса герпеса (табак, кукуруза, соя),  
**интерфероны** для лечения гепатита В и С (рис,  
турнепс),  
**лактоферин** (картофель),  
**гирудин** (рапс),  
**протеин С** (табак) для лечения тромбозов

**Иммунизирующие антигены – съедобные вакцины**

1992 – вакцина против гепатита В в табаке и  
картофеле

1999 – вакцина против гепатита в люпине и салате-  
латуке

Вакцина против гастроэнтерита – табак, картофель

Вакцина против вируса кори – латук

Вакцина против холерного вибриона – картофель

Вакцина против цитомегаловируса – картофель, табак

Вакцина против вируса папилломы – картофель

1891 г., Альбрехт Коссель:

«В то время как **первичные метаболиты** присутствуют в каждой растительной клетке, способной к делению, то **вторичные метаболиты** присутствуют в клетке только «нечаянно» и не необходимы для жизни растения. **Случайное распространение** этих соединений, их **нерегулярное нахождение** в близких видах растений, вероятно, свидетельствует о том, что их синтез связан с процессами, не являющимися неотъемлемыми для каждой клетки, а имеющими скорее **вторичный характер**».

**Только растительные клетки** способны к синтезу вторичных метаболитов

Выявлено около **100000 веществ вторичного происхождения.**

**15-25 % генов** растительных организмов отвечает за вторичный метаболизм.

Основные классы:

**Алкалоиды** – примерно 12000 структур

**Терпеноиды (изопреноиды)** – примерно 35000 структур

**Фенольные соединения** – примерно 8000 структур

**Минорные группы** – примерно 10000 структур

1803 г. – морфий из мака

## **Исследования вторичных метаболитов:**

***Фитохимия*** – изучение строения метаболитов и их распространения в растениях

***Биохимия*** – изучение путей синтеза, энзимологии и регуляции метаболизма

***Физиология*** – исследование локализации вторичных соединений в клетках и тканях растений, ее изменений в процессе онтогенеза и роль этих веществ в жизнедеятельности растений

## **Признаки вторичных метаболитов (Носов, 2005):**

1. Видовая специфичность
2. Биологически активные вещества
3. Относительно низкомолекулярные соединения (высокомолекулярные – каучук, гута)
4. Синтез из немногих первичных метаболитов

## **Функциональное значение:**

Продукты жизнедеятельности

Запасные соединения

Защитные соединения

«Биохимические инструменты» взаимодействия растений с окружающей средой

**Синтез** преимущественно в пластидах и цитозоле,  
**локализация** в вакуолях или в клеточной стенке:

**Дубильные вещества** – в подземных органах

**Эфирные масла** – в лепестках цветков, плодах, листьях, стеблях, корнях

**Алкалоиды** – в листьях, плодах и семенах, корнях, коре

Разные группы находят в динамическом состоянии:  
содержание меняется от органа к органу в ходе онтогенеза.

# **Культура каллусных клеток в получении веществ вторичного синтеза**

1. Независимость от сезона, климатических и почвенных условий
2. Возможность оптимизации синтеза и наработки необходимого количества
3. Автоматизация процесса

По качественному и количественному составу схожи вторичные метаболиты каллусных клеток и интактного растения

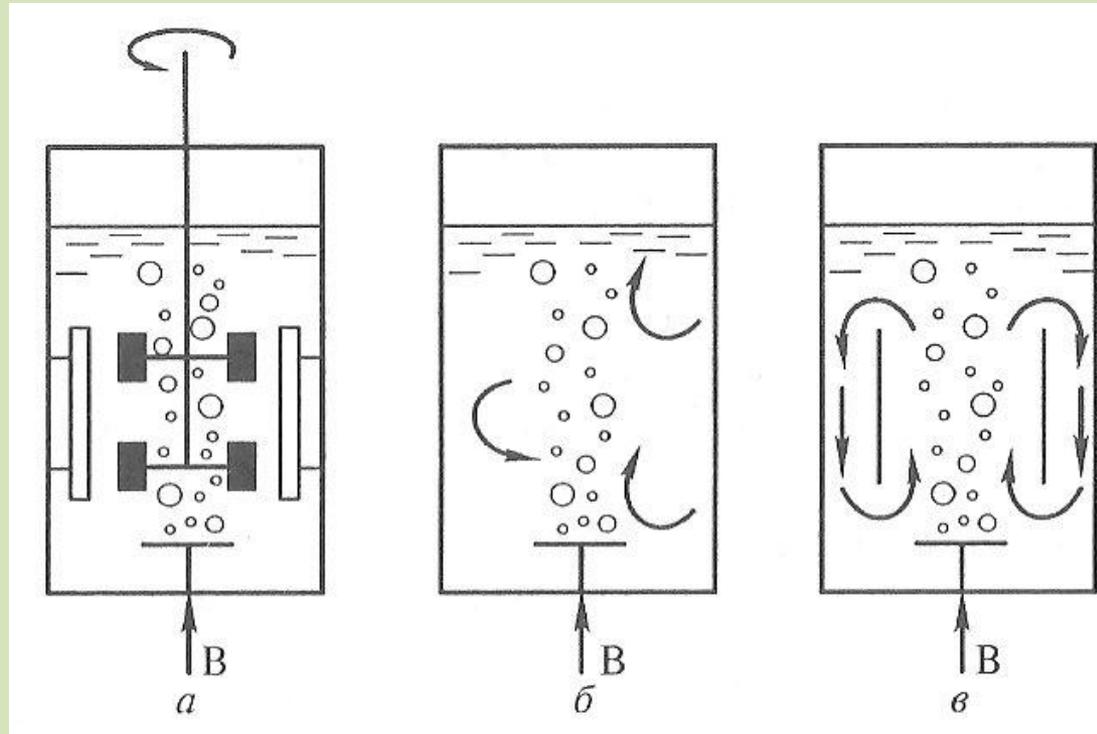
Женьшень – диосгенин, диоскорея – стероидные гликозиды, раувольфия – аймалин, стевия – стевиозид, тис ягодный – таксол (антираковый препарат)



Рис. 2.18. Структурная формула таксола

Женьшень – в природе 1 г/год, на плантации – 3 г/год,  
in vitro – 0,4 г/л в день

Килограмм корня женьшеня от 100-150 долларов  
(плантационный) до нескольких тысяч долларов  
(дикорастущий)



Вещества вторичного синтеза получают, как правило,  
из суспензионной культуры в биореакторах  
(барботажные и с механическими перемешивающими  
устройствами)

Важна стабільнасць клетак папуляцыі ў адношэнні да сінтэзы, транспарта і дэпазіцыі метаболітаў.

Сінтэз другіх метаболітаў адбываецца ўнутрыклетачных арганелах: пластыдах, мітахондрыях, ЭР; транспарт у суседнія клеткі ці ў харчавальную сроду адбываецца праз вакуолі і свабоднае прастранства клеткі і выкарыстоўваецца для дэпазіцыі метаболітаў.

**Количественный и качественный состав** можно менять изменением состава питательной среды

Женьшень – соотношение аммонийного и нитратного азота 1:3 приводило к увеличению биомассы, а 2:3 не оказывало влияния на продуктивность, но снижало накопление диосгенина.

Повышенные концентрации сахарозы более эффективны для роста массы клеток, а пониженные – для продуктивность диосгенина

## **Биореакторы промышленные**

Объем до 75000 л (FYTON, Германия)

В России женьшень до 2,5 м<sup>3</sup> (Омутнинский биохимический завод)

7,5 м<sup>3</sup> – проточное культивирование клеток женьшеня (Ярославль, ТОО «Тэмбр»)

ИФР (А.М. Носов) объем биореакторов 630 л, 2000 л (женьшень настоящий, полисциас и другие аралиевые, диоскорея дельтовидная, маралий корень и др.)

Паклитаксел – основа противораковых препаратов.

В природе – в клетках коры тихоокеанского тиса. Для лечения 1 пациента нужно снять кору с 10-12 взрослых деревьев

ОАО «БИОХИММАШ» + ИФР – технология выращивания каллусной ткани тиса тихоокеанского в ферментерах

Накопление информации о потребностях штамма-продуцента, влияние различных изменений в системе культивирования – неотъемлемая часть исследований

## **Культивирование штаммов-продуцентов в ферментере**

+

1. Малая стоимость аппарата и системы управления
2. Гибкость – в одном биореакторе разные продукты
3. Возможность варьирования времени культивирования
4. Меньшая подверженность инфицирования и мутированию
5. Удобство процесса для получения малых количеств продукта
6. Возможность поддержания условий культивирования в оптимуме
7. Удобство процесса для реализации биосинтеза

-

1. Необходимость получения каллусных или суспензионных клеток
2. Вероятность продолжительного непродуктивного времени ферментации
3. Быстрое изнашивание измерительных приборов
4. Часто более низкая производительность по сравнению с непрерывным процессом
5. Трудности поддержания необходимых параметров культивирования

## **Периодическое культивирование**

**Количество засеваемой культуры** в аппарат должно обеспечивать активную динамику роста и накопления биомассы в начальный период проведения биосинтеза

**2-10 % от рабочего объема аппарата** в зависимости от типа клеток

**Динамика** отслеживается по мере проведения ферментации

**Динамика роста и накопления целевого продукта** свидетельствует нужен ли активный рост культуры для накопления или нет

Клетки способны синтезировать некоторые вещества за счет наличия в среде **иных компонентов, помимо основных**

**Видоизменение** нормального роста клеток из-за лимитирования некоторого параметра или ингибирования

**Среди вторичных продуктов** вещества клеточной оболочки, производные аминокислот, пептидов, углеводов, нуклеотидов и др.

**Вторичные веществами** могут быть антибиотики

У бродильных организмов образуются **нейтральные вещества**: спирты, кетоны и др.

Способность к **сверхсинтезам продуктов второй фазы** роста сильно выражена у мутантов

В результате **генетических изменений** нарушается метаболизм, реакция отклоняется в сторону обильного накопления веществ, среди них могут быть ценные продукты

Значение имеет **физиологический контроль**, управление метаболизмом популяции  
**Репрессия и дерепрессия** синтеза ферментов, изменение их активности

Должны быть созданы **оптимальные условия** для биосинтеза, для этого некоторые компоненты в среде должны быть **в недостатке**

Антибиотики актиномицетов синтезируются при **лимитации недостатком фосфата**, пенициллин – **лимитация глюкозой**, полимиксин и грамицидин С – молекулярным кислородом.

Часто используют **сложные среды**, отходы различных производств

**Можно определить** фазу наиболее активного биосинтеза, скорость, продуктивность процесса, выявить оптимальную температуру, pH, степень аэрации

**Нельзя выявить** лимитирующие рост компоненты питания

Для этого служат синтетические или полусинтетические среды

Необходимо применять методы математического планирования эксперимента

# Непрерывное культивирование

Постоянная подача питательной среды в ферментер при выгрузке культуральной жидкости, в которой накоплен целевой продукт – **сохраняется постоянный объем**

Процесс полного смешивания и процесс полного вытеснения

## **Плюсы непрерывных процессов:**

возможность применения специальных аппаратов для каждой операции процесса,  
стабилизация его во времени,  
улучшение качества продукта,  
легкость регулировки,  
возможность автоматизации.

## **Процесс полного вытеснения**

Трубчатый ферментер – трубка (горизонтальная или вертикальная)

Полная кривая роста воспроизводится в пространстве

## **Хемотратное культивирование**

Вариант **гомогенного проточного культивирования** с заданным желаемым коэффициентом **разбавления**, к которому подстраивается скорость роста культур

**Концентрация биомассы** определяется отдельным компонентом питательной среды

Для деления клеток необходимо наличие молекулярного кислорода, необходимо непрерывно растворять в среде кислород

# **Ферментеры для получения веществ вторичного синтеза**

## **Аппарат оснащается**

системой аэрации (за счет изменения интенсивности перемешивания, подачи воздуха и регулирования давления внутри аппарата),  
системой термостатирования, измерения рН,  
автоматического поддержания его на заданном уровне.

## **Требования к ферментерам:**

Должен быть максимально простым по конструкции  
Должен обеспечивать оптимальные  
гидродинамические и массообменные условия

**Стерилизация ферментера** – либо в автоклаве, либо стационарно подачей острого пара в рубашку аппарата

Система измерения и контроля поддерживает исходные параметры в автоматическом режиме

**Перед засевом культуры** из ферментера отбирается проба для проверки стерильности

**Вспомогательные операции:**

Получение хорошо пролиферирующей культуры

Приготовление и стерилизация питательной среды

Техническое обслуживание аппарата

Калибровка измерительных систем аппарата

## **Обработка оборудования**

алкил-, арил- или хлор-фенол, водный раствор аммониевой соли первичных и вторичных алкилсульфатов, хлорсодержащие соединения

## **Обработки пеногасителей**

Стерилизуют непосредственно перед подачей в аппарат

Процесс культивирования длится 240 ч и более

## **Очистка и стерилизация воздуха**

**Фильтрующие элементы** – конструкции, наполненные волокнистым материалом, задерживающим микроорганизмы

**Очистка** достигается использованием высоких температур, УФ- и ионизирующего излучения, ИК-облучения, фенола, окиси этилена, солей тяжелых металлов

## **Растения – продуценты БАВ**

**Преимущества** получения лекарств из растений – широкий спектр их биологической активности и экологическая безопасность изготовления

**Целебное действие** лекарственных растений обусловлено присутствием в них БАВ – продуктов специализированного (вторичного) обмена

**Изучение путей биосинтеза вторичных метаболитов** – мечение предшественников изотопами, в последнее время стабильными изотопами с последующим анализом ЯМР

# Алкалоиды

Природные гетероциклические соединения, содержащие в циклах помимо углерода один или более атомов азота, реже кислорода

## **Предшественники – а/к:**

Окисление (отдавая водород или присоединяя кислород)

Дегидратация (отдавая воду)

Восстановление (присоединение водорода)

Соединение с различными функциональными группами

Содержание – несколько процентов  
(в коре хинного дерева до 15-20 %)

**Накапливаются в вакуоли** в виде солей яблочной, лимонной, щавелевой кислот

Алкалоид никотин **синтезируется в корнях** табака, оттуда поступает в листья, где и запасается

Известно более **12000 алкалоидов:**

**Производные** пирролидина и пиперидина, хинолина, изохинолина, индола, имидазола, пурина

**Пептидные алкалоиды**

**Алкалоиды изопреноидного происхождения, в том числе дитерпеновые и стероидные)**

**Морфин и кодеин**, каждый состоит из 5 циклов

Их коробочек снотворного мака

Морфин, тебаин, кодеин, папаверин и др.

## **Красавка беладонна**

7 алкалоидов: гиосциамин, скополамин

Медицинские препараты: бесалол, беллалгин, беллатаминал, солутан

## **Алкалоиды из барвинка**

Индольные алкалоиды винбластин и винкристин – противораковые

Резерпин, аймолин из корней **раувольфии змеиной** – гипотензивные и психотропные средства

## **Клебнелуковицы безвременника**

Алкалоид колхицин

# Изопреноиды

Большинство имеет **полициклическое строение**  
Построены из разветвленных 5-углеродных  
изопреновых единиц  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  (от 1 до  
1000)

Общим специфическим предшественником  
изопреноидов является **изопентенил дифосфат**  
Изопреноидная **боковая цепь** пренилхинонов,  
хлорофиллов **гидрофобна**, помогает ФАС  
встраиваться в биологические мембраны

**Пренилированные белки** – к остатку цистеина с С-  
конца присоединен  $\text{C}_{15}$  или  $\text{C}_{20}$ -изопреноидный  
остаток – якорь, закрепляющий белок в мембране

**Таксолы** из коры тиссового дерева – активные цитостатики, действуют на раковые клетки в очень малых дозах

### **Сердечные гликозиды (карденолиды)**

Состоят из стероидной части (агликона) и нескольких сахарных остатков

**Наперстянка пурпуровая и шерстистая** более 50 карденолидов: ланатозиды, пурпуреагликозиды (в том числе дигитоксин)

**Строфант** – лиана влажных тропических лесов Африки

К-строфантозид

**Ландыш майский** – конваллотоксин – влияет на систолическое сокращение мышцы миокарда, воздействуя на транспорт ионов калия и натрия

## **Стероидные и тритерпеновые гликозиды, или сапонины**

Тонизирующие, стимулирующие, адаптогенные свойства

При гипотонии, нервных заболеваниях и депрессиях

**Комплекс тритерпеновых гликозидов –**

панаксозидов, витамины С, В1, В2, пантотеновая, никотиновая и фолиевая кислоты

**Стероидные гликозиды** обладают фунгицидными, бактерицидными, гемолитическими свойствами, противораковая, адаптогенная, антиоксидантная, иммуностимулирующая активность

Сырье для синтеза многих гормональных и противозачаточных средств

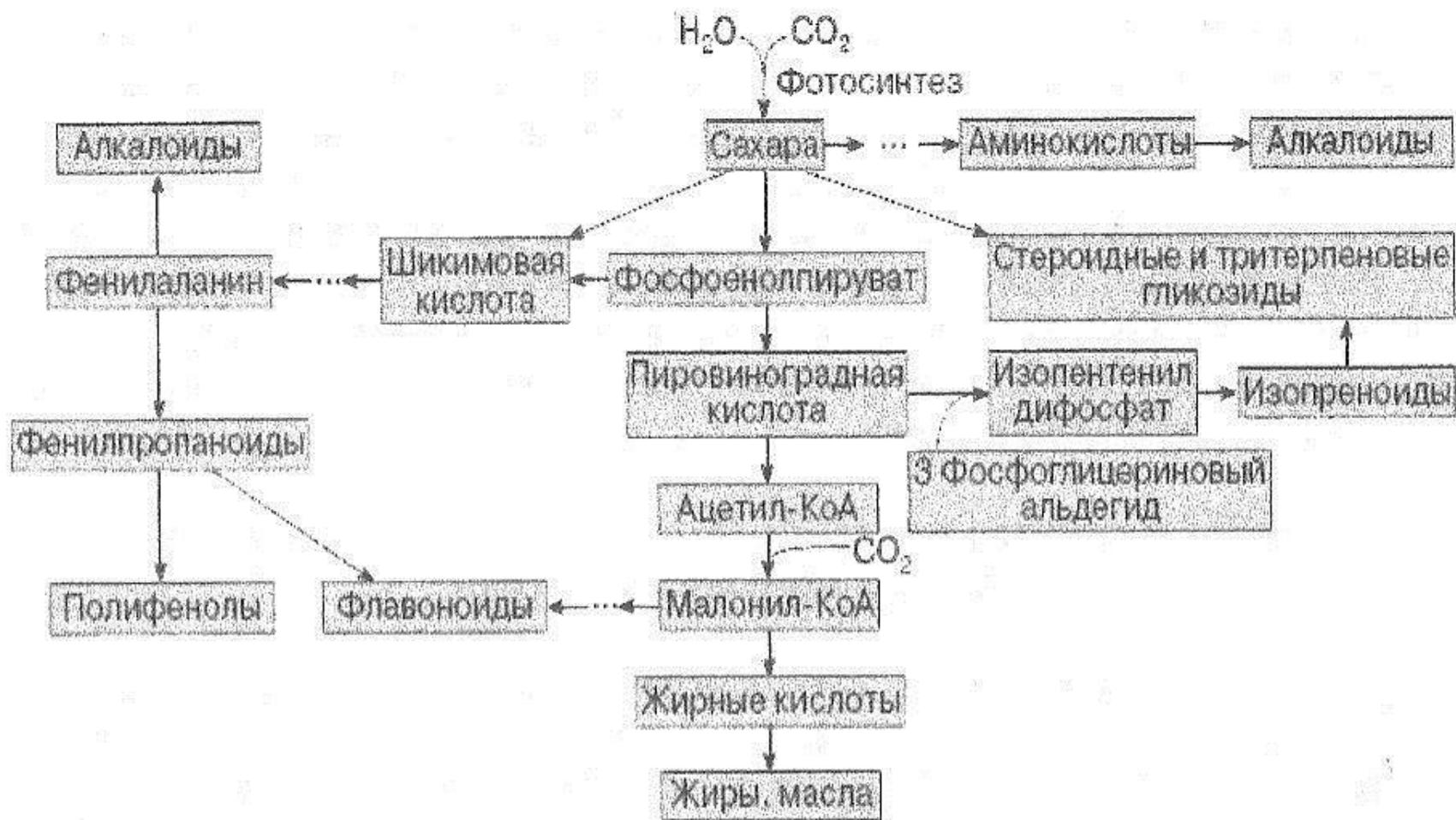
**Агликон диосгенин** в результате кислотного

## **Фенольные соединения**

Присутствие в молекуле одного или нескольких ароматических циклов, к которым присоединена одна или более карбоксильных групп

**Шикиматный путь** начинается продуктов обмена **сахаров** (из фотосинтеза), несколько стадий до предшественника **шикимовой кислоты**. Из нее образуются **фенилаланин, тирозин и триптофан**. Из **фенилаланина** через стадию оксикоричных кислот образуются **флавоноиды и катехины**.

**Флавоноиды** накапливаются в корнях солодки, траве пустырника, цветках бессмертника. Обладают желчегонным, бактерицидным, спазмолитическим, кардиотоническим, противораковым, противолучевым действием, выводят из организма радионуклиды.



**Рис. 2. 17. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из продуктов первичного обмена**