



**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 оценки

У пшеницы при селекции на хлебные качества

Оценка качества муки – косвенная
седиментации

Количество и качество клейковины

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

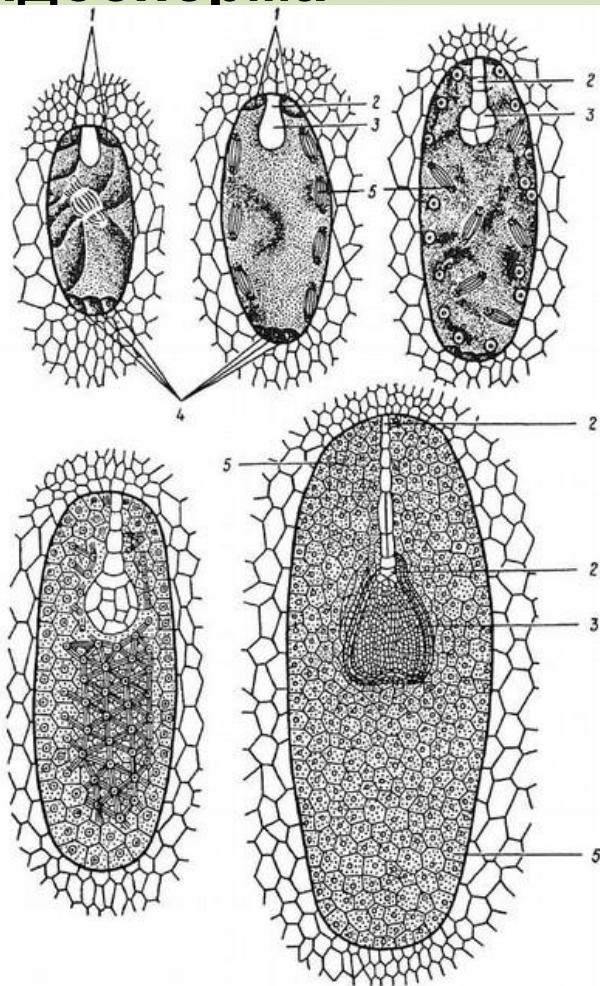
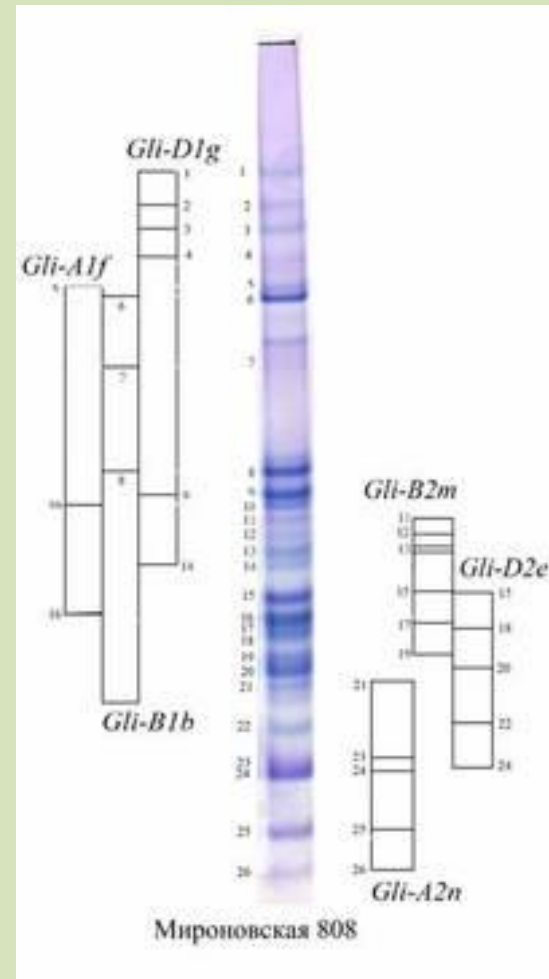


Схема последовательного развития зародыша и эндосперма у двудольных:
 1 — синергиды; 2 — подвесок; 3 — зародыш; 4 — антиподы; 5 — эндосперм



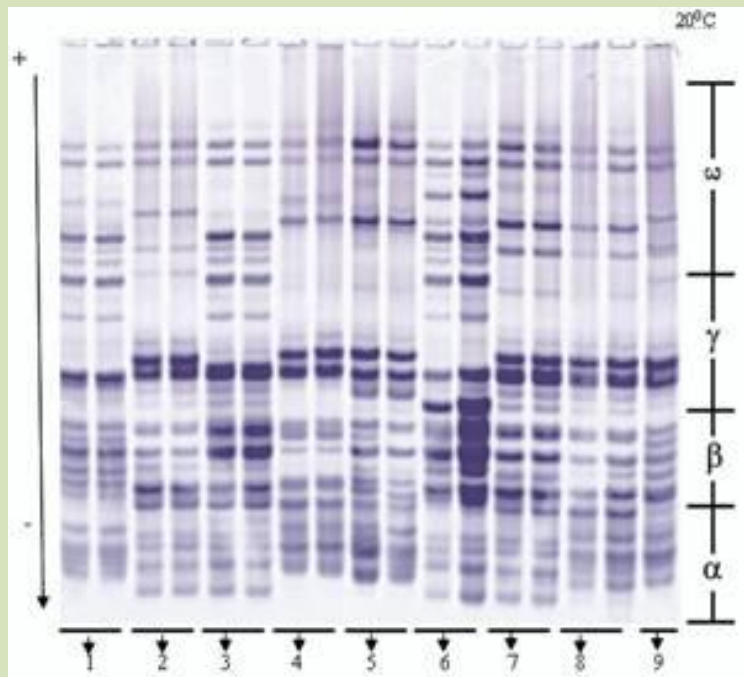


Рис. Электрофореграммы глидинокодирующих локусов мягкой пшеницы
 1 - Экинчи-84, 2 - Гобустан, 3 - Нурлу-99, 4 - Гырмызыгул, 5 - Безостая (st),
 6 - Эзаметли- 95, 7- Анза, 8 - Рузи- 84, 9 - Саратовская-29

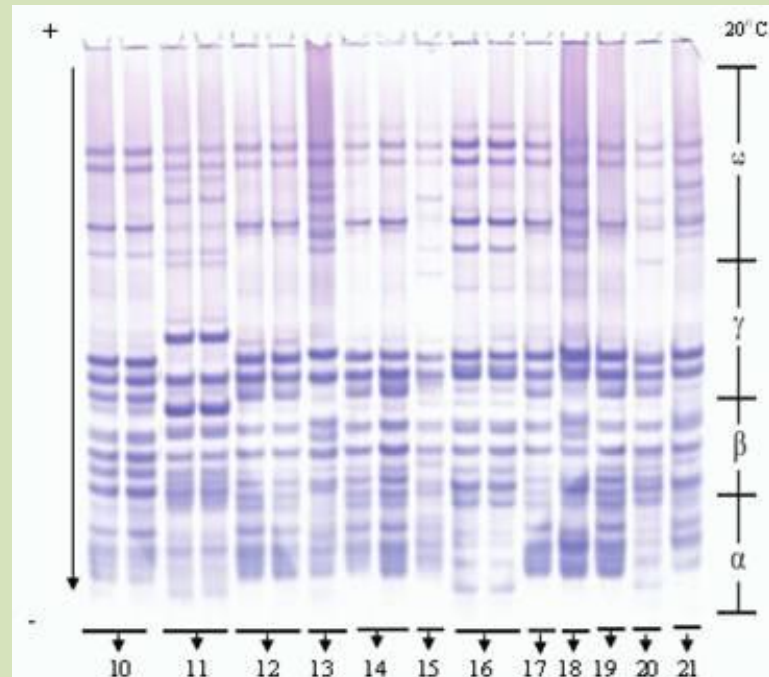


Рис. Электрофореграммы запасных белков глиадина в сортах мягкой пшеницы
 10 - Дагдаш, 11 - Дурдана, 12 - Бирлик, 13 - Бол-бугда, 14 - Безостая (st), 15 - Бейаз,
 16 - Анза (marker), 17 - Достлуг, 18 - Парзиван-1, 19 - Парзиван-2, 20 - Шеки-1, 21 - Шефер

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.

α -зеин кукурузы – низкое содержание лизина

С помощью **олигонуклеотид-направленного**

мутагеза ввели дополнительные **кодона лизина**

Модифицированный ген α -зеина клонировали в T-ДНК вектора для трансформации + **эндосперм-бокс**

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

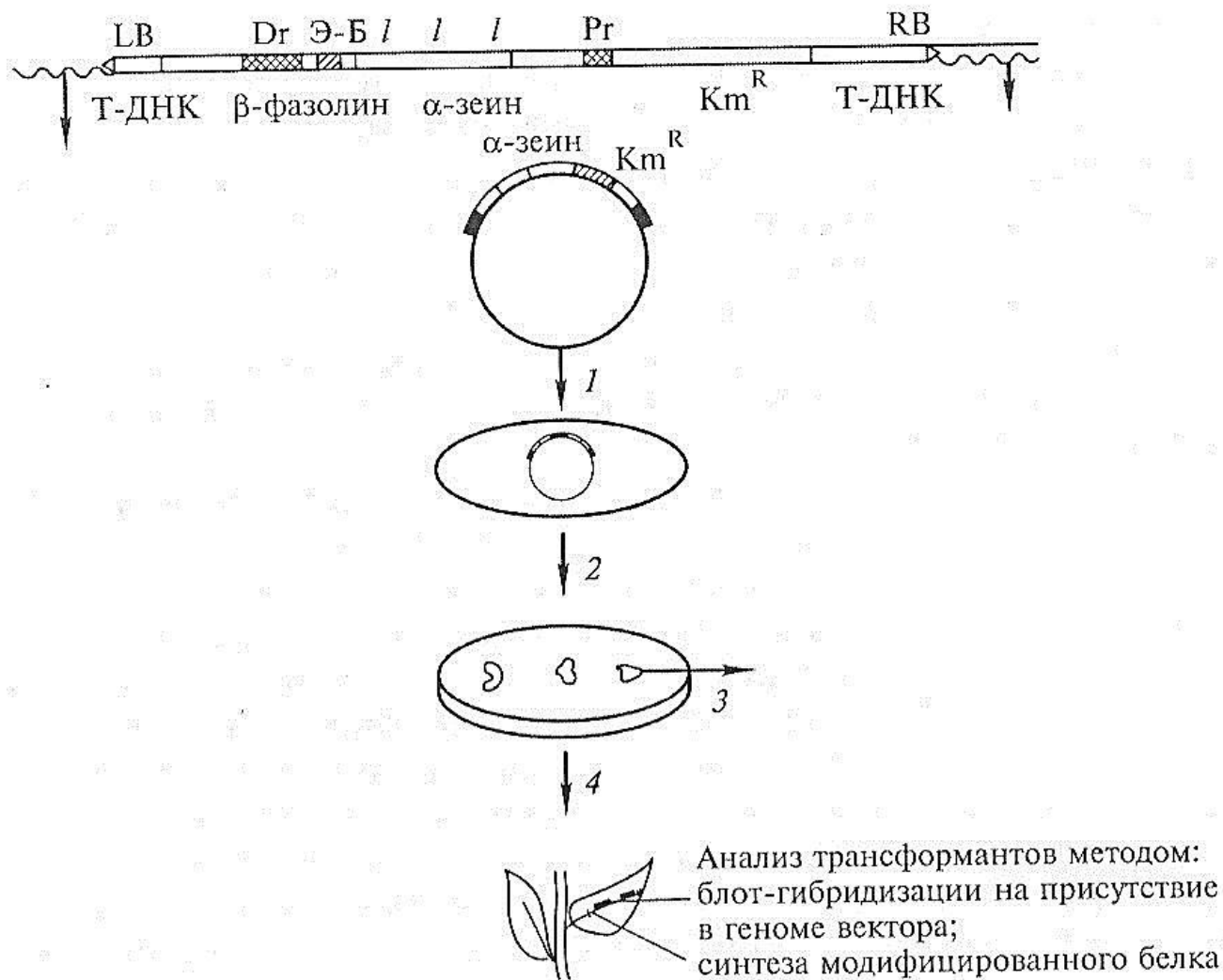


Рис. 2.5. Схема получения трансгенного растения табака с интегрированным геном α-зеина, обогащенного лизиновыми кодонами:

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.



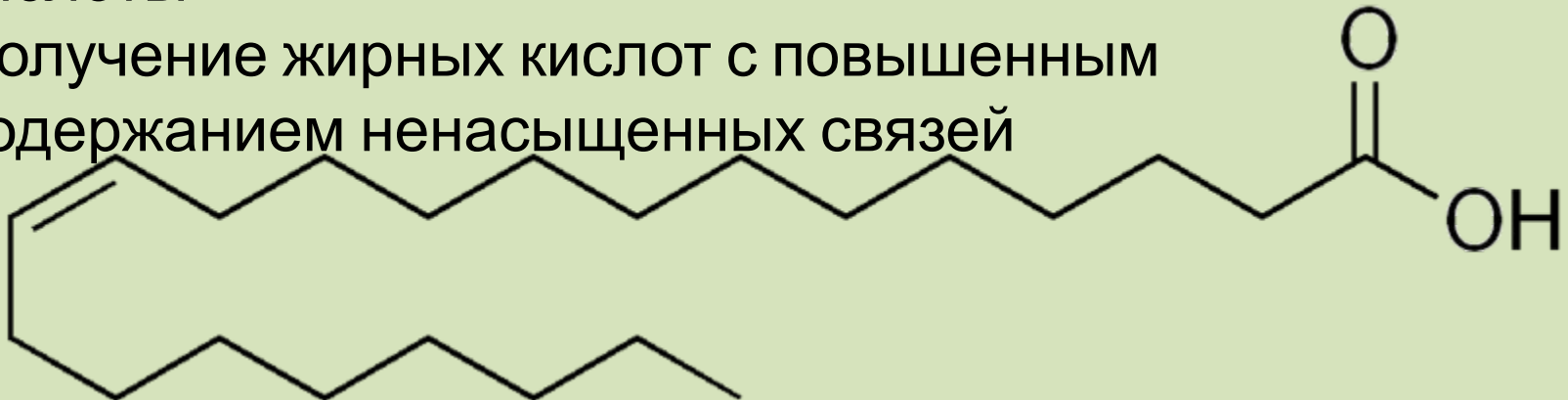
Улучшение состава жирных кислот



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



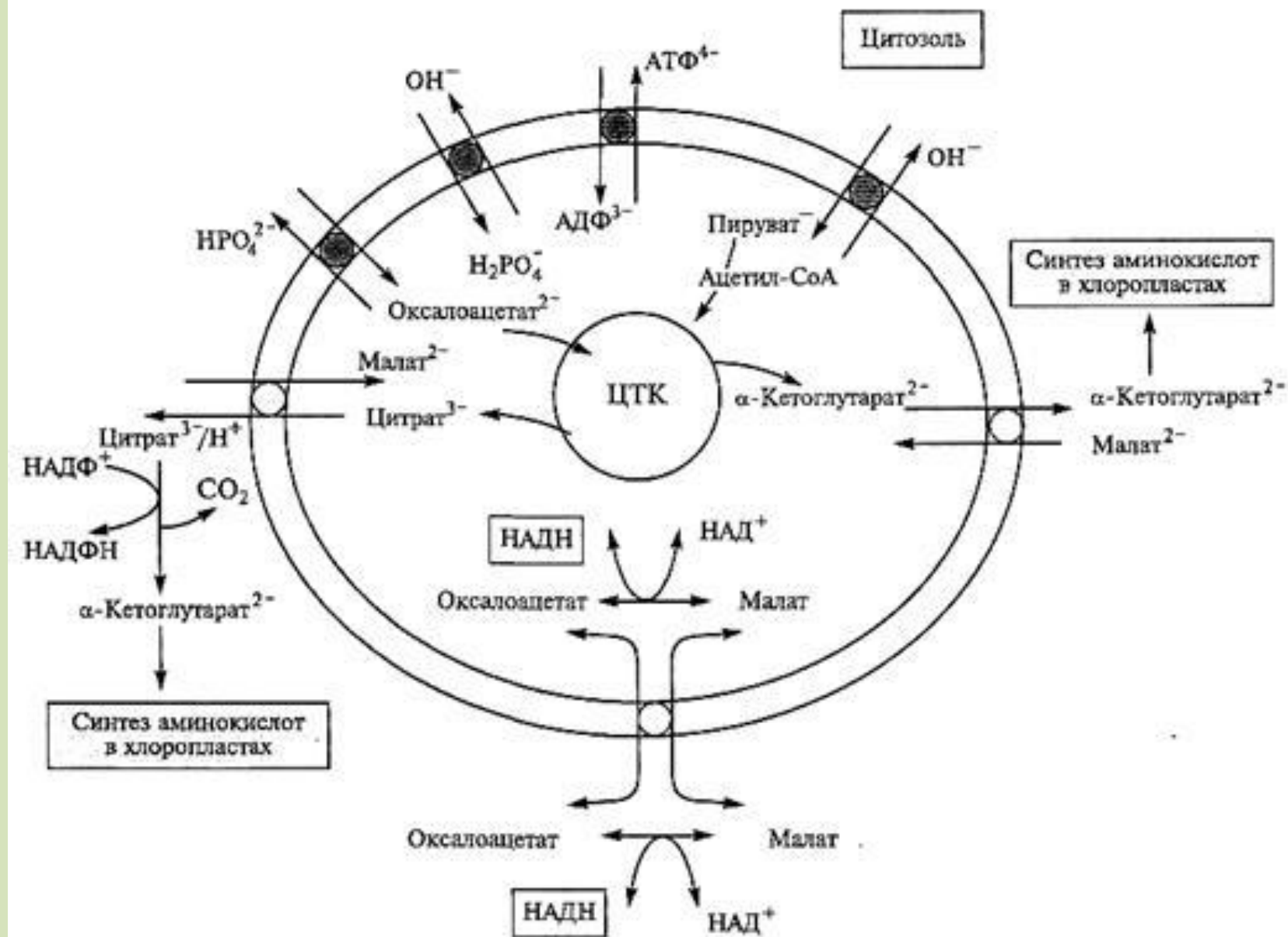
Изменение метаболизма у трансгенных растений

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

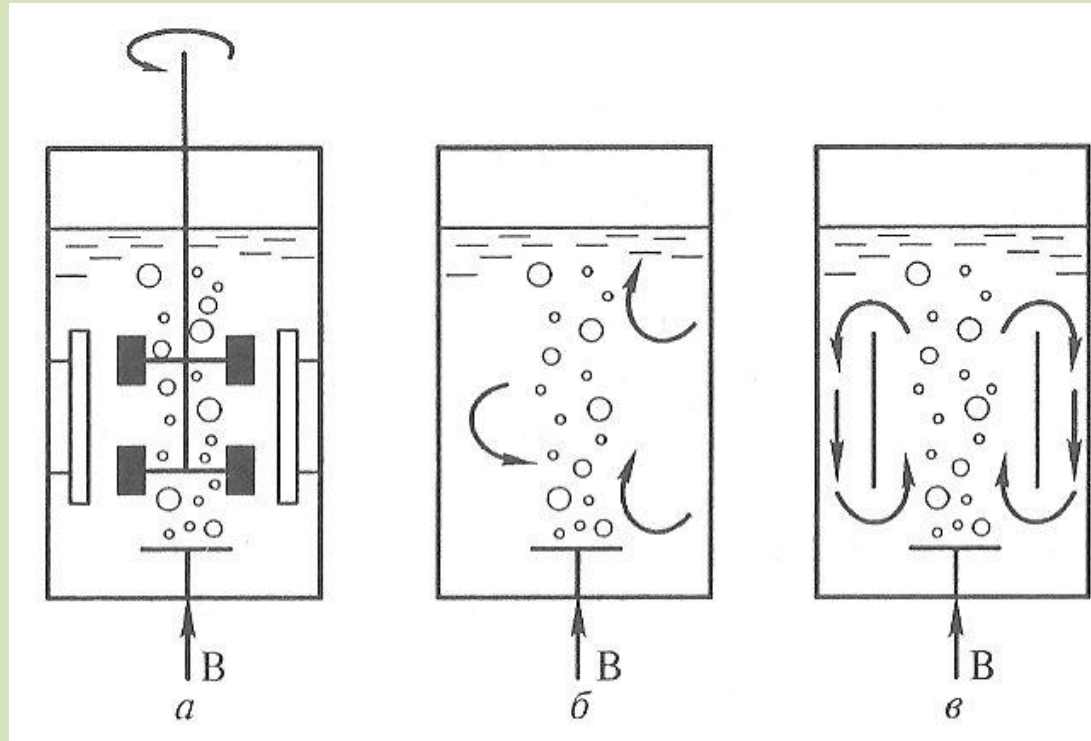
Женьшень – диосгенин, диоскорея – стероидные гликозиды, раувольфия – аймалин, стевия – стевиозид, тис ягодный – таксол (антираковый препарат)



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 метабалітаў.

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

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 м³ (Омутнинский биохимический завод)

7,5 м³ – 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 C_{15} или 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.

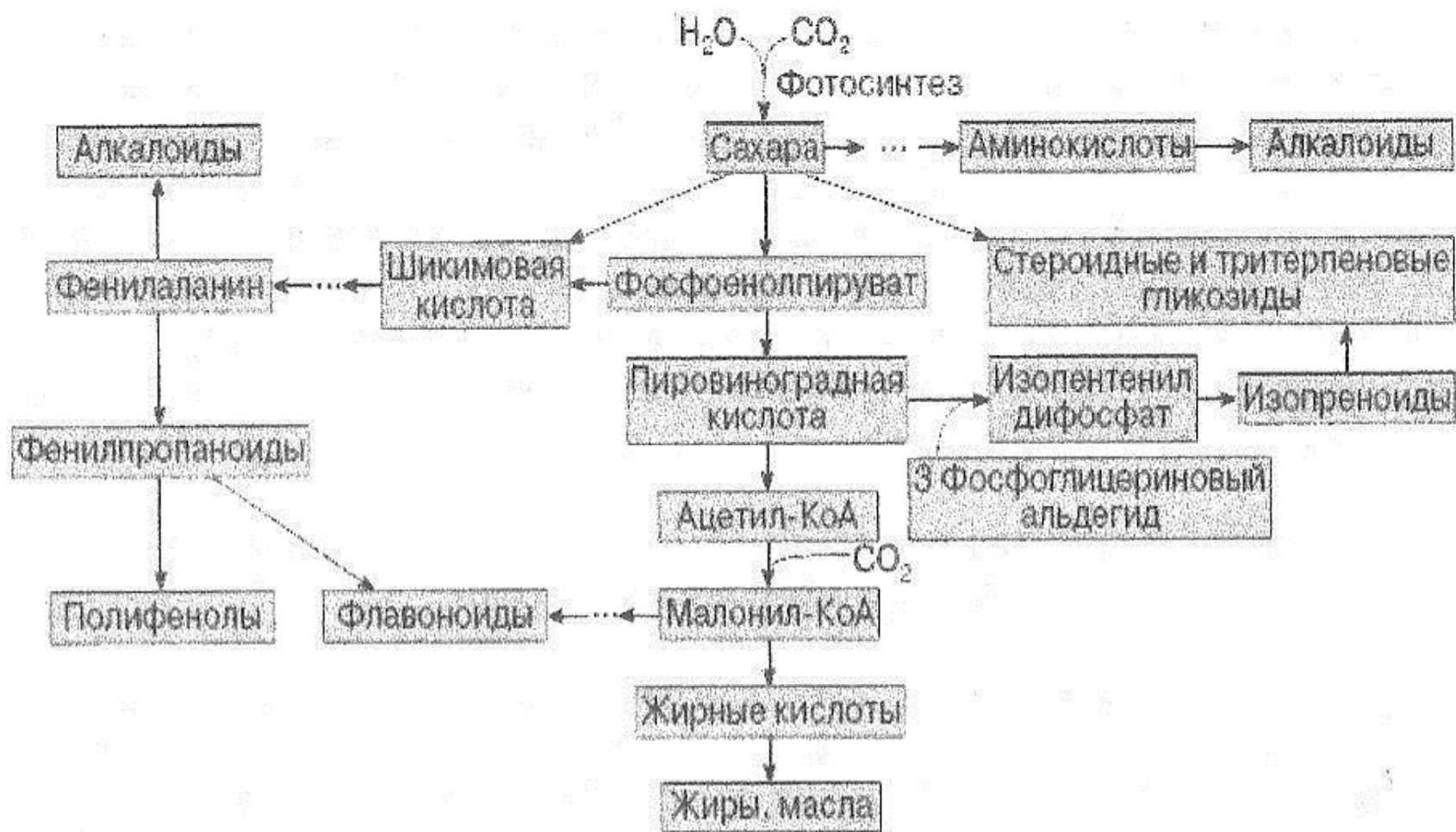


Рис. 2. 17. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из продуктов первичного обмена