

Министерство образования Республики Беларусь  
УО «Полесский государственный университет»

## **СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ**

Методическое пособие  
для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология»

Пинск  
ПолеГУ  
2018

УДК 602.3:579.8(072)  
ББК 30.16  
Ю83

**Р е ц е н з е н т ы:**

кандидат биологических наук, Шабашова Т.Г.;  
кандидат биологических наук, доцент Безрученок Н.Н.

**У т в е р ж д е н о**  
научно-методическим советом ПолесГУ

**Ю83 Юрченко Е.О.**

Селекция продуцентов : Методическое пособие для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология» / Сост. Е.О. Юрченко. – Пинск : ПолесГУ, 2018. – 41 с.

ISBN 978-985-516-531-7

В пособии описаны этапы традиционной селекции для бактерий и грибов. Основное внимание уделено толкованию терминов и понятий, применяемых для описания селекционного процесса. Даются сведения об основном оборудовании в селекционной лаборатории, основных веществах-мутагенах, кратко рассматривается применение половой и вегетативной гибридизации у грибов.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Биология», направления специальности «Биотехнология», специализации «Микробиология», для изучения дисциплин «Селекция продуцентов», «Микробиология», «Промышленная микробиология», «Основы биотехнологии».

УДК 602.3:579.8(072)  
ББК 30.16

ISBN 978-985-516-531-7

© УО «Полесский государственный университет», 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Тема 1. ОБЪЕКТЫ СЕЛЕКЦИИ.....	6
Тема 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ .....	13
Тема 3. ОЦЕНКА ПРОДУКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ.....	15
Тема 4. МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ .....	16
Тема 5. ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ .....	23
Тема 6. ОТБОР МУТАНТОВ .....	26
Тема 7. ГИБРИДИЗАЦИЯ.....	32
ЛИТЕРАТУРА .....	37

## ВВЕДЕНИЕ

Селекция продуцентов является одной из базовых отраслей биотехнологии, создавая фонд полезных микроорганизмов для микробиологической промышленности. Для проведения селекционного процесса необходимы знания по экологии микроорганизмов в природных сообществах, знание базовых микробиологических техник, физиологии и генетики бактерий и грибов. Для оценки биосинтетической способности микроорганизмов необходимо владеть методами препаративной биохимии.

В данном пособии основное внимание уделено терминологическому аппарату, применяемому для описания селекционного процесса. Основные термины в тексте выделены курсивом. В скобках после терминов даются их английские эквиваленты. Описаны основные этапы традиционной селекции.

Началом в развитии селекции грибов-продуцентов можно считать открытие пенициллина Александром Флемингом в 1929 г. Одним из основоположников селекции продуцентов в СССР был Сос Исаакович Алиханян (1906–1985) – советский генетик, организовавший в 1968 г. Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Его разработки были обобщены в монографии «Селекция промышленных микроорганизмов» (1968). Основы селекции дрожжей были заложены советским генетиком Константином Васильевичем Косиковым (Косиков, 1954, 1979). Монографии по селекции дрожжей были изданы и другими исследователями (Шигаева, 1975; Мавлани, 1977).

Кроме того, на русском языке были опубликованы монография по методам селекции (Жукова и др., 1978), учебник по методам создания штаммов-продуцентов (Дебабов, Лившиц, 1988), обзоры по вопросам селекции продуцентов ферментов (Коновалов, 1970) и аминокислот (Жданова, 1973; Жданова, Гусятинер, 1985). Методы мутагенеза, отбора му-

тантов и гибридизации у грибов изложены в справочнике «Методы экспериментальной микологии» (Левитин, 1982).

В Беларуси вопросы селекции продуцентов разрабатывались учеными Института микробиологии республиканской Академии наук, в частности, использование химических агентов в селекции (Коваленко, 1980), получение продуцентов внеклеточных белков (Полупанов, 1986).

## Тема 1. ОБЪЕКТЫ СЕЛЕКЦИИ

Под *продуцентами*\* в данном пособии понимаются штаммы-продуценты. *Штамм-продуцент* (producer strain) – это естественный или искусственно полученный штамм микроорганизма, который продуцирует определенное биологически активное соединение и может быть использован в биотехнологической промышленности. *Суперпродуцент* (super-producer) – это микробный штамм, обеспечивающий биосинтез определенного продукта в высокой концентрации, который может быть использован для эффективного промышленного микробиологического производства этого продукта; часто наследственный аппарат клеток суперпродуцента избирательно изменен (Тарантул, 2016).

Как продуценты в разной степени уже освоены представители всех царств живого. Примеры продуцентов из основных филогенетических линий организмов приведены в табл. 1. Опыт использования в биотехнологии представителей нескольких крупных филогенетических групп – Excavata, Alveolata, Rhizaria – отсутствует или почти отсутствует из-за сложной техники поддержания протист в чистой культуре. В данном пособии селекция рассматривается применительно только к представителям царств Бактерии (Bacteria) и Грибы (Fungi).

---

\* Термин «продуцент» (producer) в западной литературе, как правило, не используется применительно к объектам биотехнологии, а означает автотрофный организм, находящийся в основании экологической пирамиды в экосистеме (Odum, 1983; Биологический..., 1986).

**Таблица 1. Примеры продуцентов из крупнейших филогенетических линий живых организмов**

Царство / Подцарство / Инфрацарство / Надотдел* – русский эквивалент названия группы	Вид, ссылка на использование как продуцента
Archaea /// – Археи	<i>Pyrococcus furiosus</i> (Schiraldi et al., 2002)
Bacteria /// – Бактерии	<i>Bacillus subtilis</i> (Schallmey et al., 2004)
Protozoa / Eozoa / Euglenozoa / – Эвгленобионты	<i>Euglena gracilis</i> (Takeyama et al., 1997)
Protozoa / Eozoa / Excavata / – Экскаваты	—
Protozoa / Sarcomastigota // – Саркомастигофоры	<i>Amoeba limax</i> (Sukhareva-Buell, 2003)
Chromista / Nacrobia // – Криптомонადы и Гаптофиты	<i>Pavlova</i> sp. (Ryckebosch et al., 2014)
Chromista / Harosa / Halvaria / Alveolata – Альвеоляты	—
Chromista / Harosa / Halvaria / Heterokonta – Гетероконты	<i>Leptomitius lacteus</i> (Fox et al., 2000), <i>Thalassiosira</i> sp. (Ryckebosch et al., 2014)
Chromista / Harosa / Rhizaria / – Ризарии	—
Fungi /// – Грибы	<i>Aspergillus niger</i> (Schuster et al., 2002)
Plantae /// – Растения	<i>Chlorella vulgaris</i> (Morais et al., 2015)
Animalia /// – Животные	Культура клеток беспозвоночного – мшанки <i>Bugula neritina</i> (Kerr et al., 1996)

\*Филогенетические линии даны по Simpson, Roger (2004), классификация дана по Ruggiero et al. (2015).

Применительно к микробиологии *селекцией* (selection) называют выведение новых и улучшение существующих штаммов-продуцентов. Также селекцию в широком смысле понимают как науку о методах создания штаммов микроорганизмов с нужными человеку признаками; теоретической основой селекции является генетика (Биологический энциклопедический словарь 1986; Картель и др., 2011). В биотех-

нологии под селекцией в узком смысле понимают также систему приемов выделения организмов по определенному признаку (признакам) из смешанной популяции (Zaid et al., 1999).

Существует подразделение селекции на *аналитическую* (analytical selection), при которой проводят анализ исходной естественной популяции с разложением ее на отдельные линии для последующего их отбора, и *синтетическую* (synthetical selection) – использование для отбора штаммов, полученных в результате гибридизации (Картель и др., 2011).

**Объекты селекции.** Объектами, с которыми работает селекционер продуцентов, являются культура, субкультура, пропадаула, колония, индивидуальный мицелий, изолят, штамм, клон.

*Микробная культура* – популяция микроорганизмов на питательной среде *in vitro*, находящаяся в состоянии размножения или закончившая его. *Чистая культура* состоит из клеток одного вида микроорганизма, *смешанная* (первично выделенная из природных источников) – из двух и более видов (Биологический энциклопедический словарь, 1986).

*Моноспоровая культура* – это потомство одной грибной споры, изолированной с помощью микробиологических техник. При селекции грибов посев может производиться половыми спорами, либо спорами бесполого размножения. *Половые споры (мейоспоры)* – гаплоидные споры, возникающие в результате мейоза или следующих за ним митотических делений. К ним принадлежат аско- и базидиоспоры. Споры бесполого размножения (*митоспоры*) – образуются только в результате митотических делений, могут содержать как одно ядро, так два и более ядер с различным набором аллелей, т.е. генетически разнокачественные ядра. *Полиспоровая культура* – проросшая из группы грибных спор бесполого размножения (спорангиоспор или конидий) или группы спор полового размножения (обычно аско- или базидиоспор).

*Субкультура* (subculture) – это культура, получаемая пересевом части чистой культуры на свежую питательную сре-



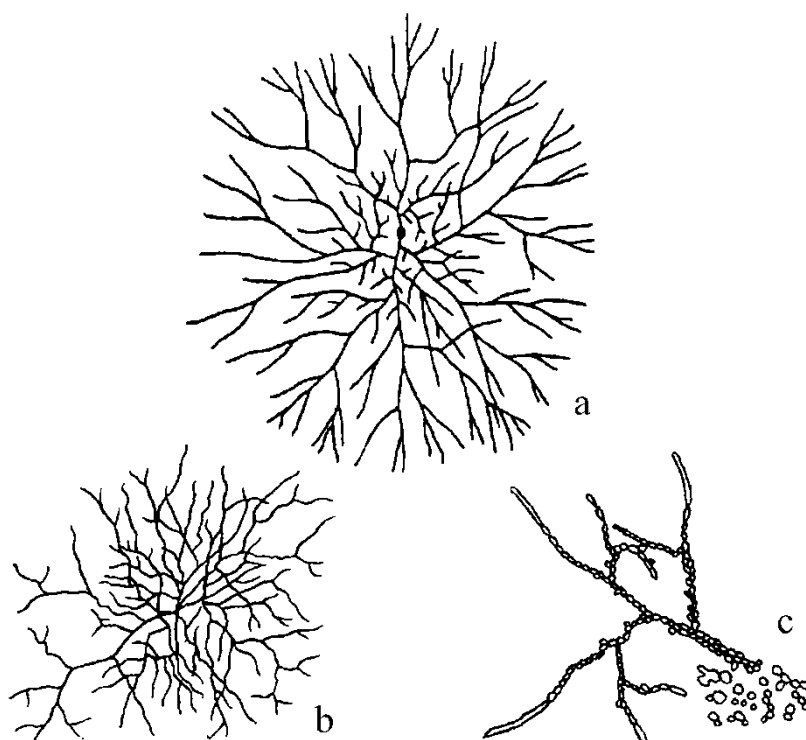
ду (Дмитриева, Дмитриев. Русско-английский словарь терминов по микробиологии, 1991).

*Пропагула* (propagule) – любой бактериальный или грибной зародыш, способный развиться (прорасти) в колонию или мицелий. Пропагулами являются отдельные бактериальные клетки, споры бактерий, цепочки клеток, спорангиоспоры, конидии и половые споры грибов, фрагменты мицелия. Если пропагула дает начало изолированной колонии, то ее называют *колониеобразующей единицей* – КОЕ.

*Колония*\* (colony) – видимое невооруженным глазом скопление клеток или мицелия, возникающее в процессе роста и размножения одного вида микроорганизма на (или в) плотном питательном субстрате. В естественных условиях колонии могут возникать, например, в почве и на поверхности растений. В практике селекции колонии наблюдаются при посеве микробов на (или в) агаризованную среду (Биологический энциклопедический словарь, 1986). Наиболее корректно термин «колония» употребляют только в отношении одноклеточных, немиецелиальных форм – бактерий и дрожжей. Поскольку мицелий, выросший из отдельной пропагулы, представляет целостный организм, объединенный регуляцией посредством внутриклеточных растворимых сигнальных молекул, то колонией он не является (рис. 1). Мицелий образуют настоящие грибы, псевдогрибы, актинобактерии. В качестве колонии правомерно рассматривать распадающийся мицелий или скопление мелких самостоятельных мицелиев, но только в том случае, если между ними не образуются перемычки из гиф – *анастомозы*. Единицу мицелиальных форм называют *индивидуальным мицелием*, ковром (mat), ковриком или просто *индивидом*. Для грибов применяют термин *грибной индивид*.

---

\* Не следует смешивать с термином *колониальный организм*, под которым понимают те организмы, у которых дочерние особи при бесполом размножении остаются соединенными с материнским организмом (Биологический..., 1986).



**Рис. 1.** Примеры мицелиев: **a** – индивидуальный мицелий *Tricholoma* sp., выросший из отдельной базидиоспоры; **b** – индивидуальный мицелий актиномицета; **c** – мицелий нокардии, распадающийся на отдельные бактерии (а – из Clémentçon, 2004 по Fries, 1934; б, с – по: Руководство к практическим занятиям по микробиологии ; под ред. Н.С. Егорова. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.)

*Изолят* (isolate) – первая чистая культура гриба (в том числе моноспоровая) или бактерии, полученная из какого-либо конкретного природного источника (Kirk et al., 2008; Картель и др., 2011).

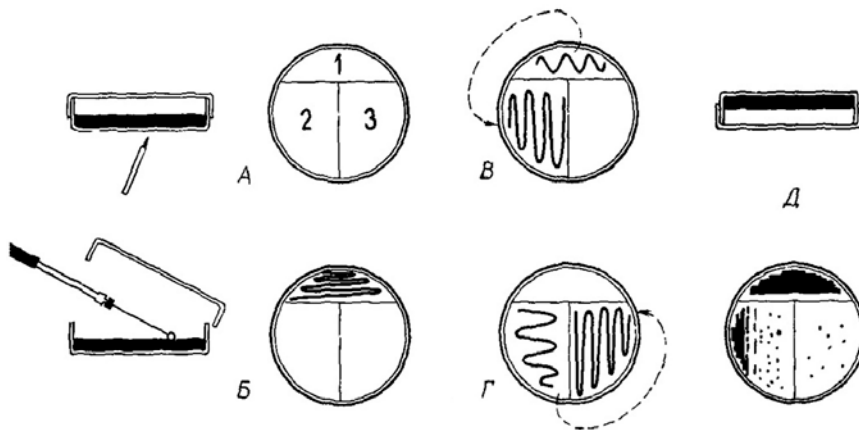
*Штамм* (strain) – группа клонально родственных индивидов или клеток (Kirk et al., 2008), или же чистая культура микроорганизма, обладающая определенными физиолого-биохимическими свойствами, выделенная из определенного источника или полученная в результате мутации. Иногда как синоним употребляют термин *линия* (line), подчеркивая поддержание штамма во времени путем пересевов (Биологический энциклопедический словарь, 1986; Картель и др., 2011).

*Диким штаммом* (wild strain) называют штамм, выделенный из природного источника и не подвергнутый изменению наследственного материала в процессе селекции.

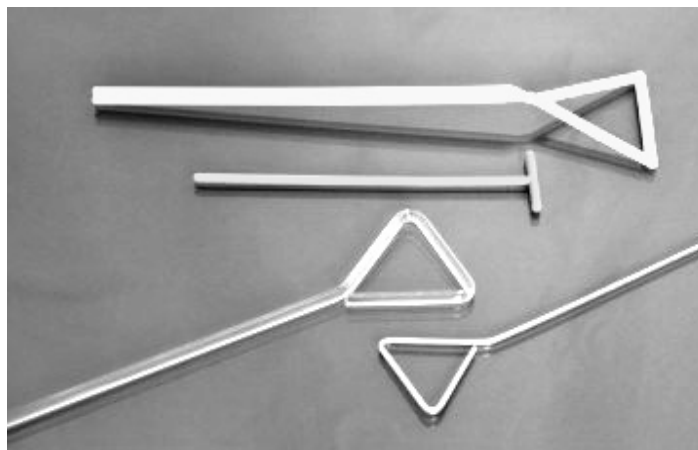
*Клоном* (clone) в микологии называют штамм гриба, размножаемый только фрагментацией мицелия. Клоном в бактериологии и применительно к дрожжам называют популяцию клеток, полученную из одной родительской клетки в результате бинарного или митотического деления. Клонирование подразумевает генетическую идентичность потомков, хотя нередко при клонировании могут проявляться мутации (Фирсов, 2006). *Субклон* (subclone) – это одна из популяций клеток или отдельный мицелий, полученные в ходе клонирования.

*Сток-культурой* (stock) в биотехнологии называют отселектированный штамм, используемый для каких-либо целей (в том числе как продуцент), и служащий для последующего размножения. Часто сток-культуру закупают у фирмы-производителя. В микологии сток-культурой иногда называют вторичный (он же дикариотический, или гетерокариотический мицелий) базидиальных грибов, отличающийся энергичным ростом (Kirk et al., 2008, следуя Raper, 1966).

***Получение изолированных колоний и мицелиев.*** Для разобобщения пропагул и получения из них изолированных колоний прибегают к традиционным микробиологическим методам. Самые простые методы для аэробов – это рассев суспензии бактерий или грибов по методу Дригальского и посев бактерий или дрожжей истощающим штрихом (рис. 2). Для посева истощающим штрихом используют стерильную микробиологическую петлю. Для рассева по Дригальскому используют стерильный шпатель, изготовленный из стекла, металла или пластика (рис. 3). Рассев заключается в том, что каплю микробной суспензии помещают в середину агаровой пластины на чашке Петри и равномерно распределяют по всей поверхности агара. Если суспензия содержит слишком большое количество пропагул, то для получения изолированных колоний тем же шпателем, не стерилизуя его, протирают поверхность среды во 2-й и последующих чашках Петри. В некоторых протоколах селекции (см. тему 6) культура высевается на агаровую пластину в виде *газона*, т.е. в большой концентрации, без разобобщения клеток.



**Рис. 2. Посев бактерий штрихом для получения изолированных колоний (по: Криг Н. Получение накопительных и чистых культур // В кн.: Методы общей бактериологии ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. В 3-х т. – Т. 1. – М. : Мир, 1983)**



**Рис. 3. Микробиологические шпатели**

## Тема 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ

Для проведения селекционной работы с бактериями и грибами традиционными методами лаборатория в самой минимальной конфигурации должна включать зоны, т.е. отдельные помещения, и оборудование, перечисленное ниже. Зона 2 не должна быть проходным помещением и отделка данной зоны должна обеспечивать влажную уборку и дезинфекцию пола, стен, потолка. Периодической санобработки требуют также горизонтальные поверхности крупного оборудования и мебели.

### *Зона 1. Моечная/автоклавная/приготовления сред*

*Основное оборудование:*

Мойка лабораторная двухсекционная

Стол для сушки посуды

Сушилка для посуды навесная

Шкаф для хранения посуды, реагентов и расходных материалов

Автоклав (паровой стерилизатор) вертикальный, объем камеры 60 л (на 2 корзины)

Бикс – металлический барабан с крышкой и отверстиями для проникновения пара – для стерилизации и хранения чашек Петри и другой стеклянной посуды

Сухожаровой шкаф – для стерилизации стеклянной посуды и инструмента

Стол рабочий

Весы аналитические (точность 0.0001 г)

Весы лабораторные (точность 0.01 г)

Посуда мерная (стаканы, цилиндры) на 50, 250, 500 мл

Пипет-дозаторы регулируемые, со сменными наконечниками, объемом 5–50 мкл, 20–200 мкл, 100–1 000 мкл

Шкаф для лабораторных халатов и личных вещей

## ***Зона 2. Посевная/термостатная***

*Основное оборудование:*

Бокс микробиологический (настольный или ламинарный)

Горелки или спиртовки посевные

Баня водяная – для плавления агаризованных питательных сред

Шкаф для хранения стерильных готовых питательных сред

Термостат – для инкубирования культур

Шейкер-инкубатор – термостатируемый шкаф с возможностью крепления и непрерывного встряхивания колб с культурами в жидкой питательной среде

Стол манипуляционный

Микроскоп лабораторный (с максимальным увеличением  $\times 1\ 000$  или  $\times 1\ 500$ )

Лупа бинокулярная

Холодильник для хранения штаммов

Холодильник для замедления роста культур

Лампа бактерицидная

При работе с продуцентами важно соблюдать чистоту культур, так как примесные микроорганизмы не только образуют вредные для эксперимента метаболиты, но порой могут из-за своей высокой конкурентной способности полностью заместить штамм-продуцент.

### ТЕМА 3. ОЦЕНКА ПРОДУКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ

Важнейшим признаком штаммов, подвергаемых отбору, является продукция целевого экономически значимого вещества, или нескольких таких веществ. Такие продукты метаболизма делят на: (1) *первичные метаболиты* – аминокислоты, азотистые основания, нуклеотиды, витамины, служащие для ростовых процессов; (2) *вторичные метаболиты* – антибиотики, токсины, алкалоиды, не используемые организмом в ростовых процессах; (3) биополимеры – ферменты и полисахариды с молекулярной массой более 10 000. Вещества-метаболиты также разделяют на две основные группы, определяющие технологию их дальнейшей очистки: *внутриклеточные*, которые в живых клетках не выделяются за пределы клеточной стенки, и *внеклеточные*, или *секретируемые*, они же *экзогенные*, которые накапливаются в среде культивирования.

Для внеклеточных метаболитов *уровень продукции* выражается в единицах массы данного вещества на объем культуральной жидкости – мкг/л, г/л и т.д., после определенного периода культивирования. Если целевой продукт – фермент, то его количество в среде может быть выражено в единицах активности (Жданова, 1989). Международная *единица активности фермента* (Е) – это количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 минуту. Другая единица для измерения количества фермента, это *катал* (кат), равная количеству фермента, превращающего 1 моль субстрата за 1 секунду (Тарантул, 2016).

Продукты микробного метаболизма должны синтезироваться в таком количестве, которое оправдало бы сырьевые и энергетические затраты на культивирование штамма и очистку вещества, т.е. их продукция должна быть рентабельной (Жданова, 1989). Также вещества, получаемые биотехнологическим путем, должны быть дешевле их аналогов, получаемых путем химического синтеза.

## Тема 4. МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ

Основными методами селекции являются отбор, мутагенез, гибридизация, полиплоидия. Полиплоидия применяется на дрожжевых организмах. Современные приемы создания штаммов-продуцентов включают генетическую инженерию (Биологический энциклопедический словарь, 1986; Картель и др., 2011).

*Традиционными методами селекции* являются ступенчатое клонирование, индуцированный мутагенез с отбором случайных мутантов, отбор по фенотипу, отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным генотипом, гибридизация (Жданова, 1989).

*Генетическая инженерия* (genetic engineering) – это создание новых форм биологически активных ДНК, генетически новых клеток и организмов путем изменения структуры генов или переноса генов. *Генная инженерия* (gene engineering, gene technology) является основным разделом генетической инженерии, который рассматривает процессы выделения, конструирования, клонирования генов, создания банков генов. Нередко понятия генетическая и генная инженерия считают синонимами (Картель и др., 2011).

Простейший отбор, или селекция, проводится из природных популяций бактерий и грибов. Конечной целью является создание генофонда микроорганизмов с желаемыми свойствами. Для аэробов процедура отбора начинается с посева спор бактерий или грибов на поверхности полноценной агаризованной питательной среды. В дальнейшем отдельные споры дают колонии или индивидуальные мицелии, которые выбирают по какому-нибудь признаку и пересевают в чистую культуру.

Для описания процессов размножения культуры применяют термины клонирование, субклонирование, субкультивирование, пассаж.

*Клонированием* (cloning) в селекции продуцентов называют получение многих дочерних колоний бактериальных



или дрожжевых клеток из одной колонии-родоначальника путем разобращения ее клеток. Менее правильно применять этот термин к процедуре посева грибов, образующих конидии, так как конидии являются спорами бесполого размножения, а не строго вегетативными пропадаулами. Процесс вторичного клонирования называют еще *субклонированием*. Процесс получения субкультуры (см. выше) называют субкультивированием (sub-culturing).

*Пассаж* – это пересев культуры микроорганизма на новую по составу среду. Обычно термин употребляется с числовым значением (1-й пассаж, 2-й пассаж и т.д.), что указывает на способность организма адаптироваться к данной среде. При полной адаптации число пересевов не ограничено. При отсутствии адаптации рост возможен при первом пассаже, например за счет компонентов среды инокулята, но при последующих пассажах рост культуры будет сильно замедляться или совсем прекратится (Фирсов, 2006).

Четырьмя основными стадиями традиционной селекции являются (1) выбор вида микроорганизма из природных популяций; (2) подготовка исходного штамма к селекционной работе; (3) индуцированный мутагенез; (4) отбор среди мутантов. Для выбора вида микроорганизма из природных популяций нередко прибегают к анализу целых сообществ.

### ***Подготовка исходного штамма к селекционной работе***

На подготовительном этапе изучается естественная изменчивость продуцента по уровню продукции желаемого вещества, и параллельно – по наиболее заметным морфологическим признакам, т.е. признакам колоний или мицелия.

Для начала производят «чистку культуры» – среди не менее 100 клонов исходного штамма, с типичной для данного вида морфологией, выбирают один клон, обладающий наиболее высоким (по отношению к исходному штамму) и воспроизводимым при пересевах уровнем продукции желаемого вещества.

Следующая процедура – это *стабилизация культуры по количественному признаку*. Клон с наиболее высоким уров-

нем продукции рассевают на чашках Петри, и оценивают по уровню продукции не менее 100 клонов первого поколения. Значения уровней продукции таких субклонов выражают в % по отношению к уровню продукции родительского клона и распределяют в виде вариационного ряда. Вычисляют среднее арифметическое ( $X$ ), среднеквадратическое отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент изменчивости  $c_v = \sigma \times 100 / X$ . Субклоны из крайней правой части ряда повторно оценивают по уровню продукции, и оставляют один из них. С данным клоном повторяют процедуру посева, оценки продуктивности и построения вариационного ряда. Сравнивают значения  $c_v$  двух полученных вариационных рядов. Если эти значения достоверно не различаются, можно закончить подготовку культуры, оставив субклон с высоким уровнем продукции их первого вариационного ряда. Если произошло снижение  $c_v$ , то из крайней правой части второго ряда снова отбирают лучший клон, рассевают его, оценивают по продукции и строят третий вариационный ряд. Если  $c_v$  второго и третьего рядов не различается, клонирование прекращают. В результате такого ступенчатого клонирования под действием стабилизирующего отбора получается наиболее однородная по данному признаку популяция. Однородность отобранной культуры может снижаться при многократных пересевах на новые среды и длительном хранении.

### ***Процедура отбора штаммов. Прототрофы и ауксотрофы***

Существуют следующие виды отбора:

*Отбор по фенотипу (phenotypic selection)* – самый простой способ, когда колонии или мицелиальные ковры отбирают по внешним признакам (цвет, текстура, вертикальный профиль, скорость радиального роста). Под фенотипом здесь понимают только внешнее строение, цвет, особенности споруляции и роста, но не наличие определенных метаболитов.

*Направленный отбор (directional selection)* – форма отбора, в результате которого происходит смещение среднепопуляционного значения признака в сторону, определяемую селекционером.

*Дифференциальный отбор* (differential selection) – отбор по количественному признаку, направленный на увеличение разницы между средней для вида микроорганизма величиной и средней для отобранных штаммов.

*Периодический отбор* (recurrent selection) – отбор из популяции микроорганизмов периодически появляющихся быстрорастущих мутантов, в результате чего исходная популяция замещается популяцией с новым генотипом, обладающей более быстрым ростом.

*Линейный отбор* (line selection) – направленный отбор в ряду поколений по нескольким направлениям, приводящий к созданию линий, в которых отбор продолжается с учетом межлинейных сравнений. Преимущество получают микроорганизмы с определенным отклонением от среднего значения по сравнению с популяцией исходного типа.

*Корреляционный отбор* (correlated selection), или вторичный эффект отбора – изменение признаков, не подвергающихся прямому отбору, в результате их корреляции с отбираемым признаком.

*Тандемный отбор* (tandem selection) – улучшение популяции путем отбора поочередно по одному, а потом по другому признаку; оба признака экономически значимы. Производится в ряду поколений. При отрицательной корреляции между признаками эффективность отбора снижается (Картель и др., 2011).

*Скринингом* (screening) называют выборочное выделение штаммов, синтезирующих определенный метаболит, несколько родственных метаболитов, или обладающих определенной биологической активностью, из крупной выборки из одного или нескольких природных источников. Выборка может включать как представителей одного вида, так и многочисленные виды бактерий или грибов, составляющих целые сообщества. Скринингом в узком смысле называют выделение мутанта или рекомбинанта, обладающего нужным фенотипом или генотипом, из многочисленной популяции микроорганизмов, например, после обработки мутагеном (Фирсов, 2006).

Длительный селекционный процесс над определенным видом грибов может быть проиллюстрирован сложной *родословной* конечного штамма. Пример родословной – это Висконсинская серия *Penicillium chrysogenum*, продуцента пенициллина, полученная в США. Обработка штаммов этой серии, начиная от *P. chrysogenum* NRRK 1951, физическими и химическими мутагенами длилась более 30 лет и позволила повысить уровень продукции антибиотика в несколько тысяч раз. В СССР сложную родословную имел также штамм-суперпродуцент *P. chrysogenum* (Генетические основы селекции грибов, 2005, по Алиханян, 1977).

В процессе селекции часто используется минимальная и полная питательные среды, а также селективные среды. Они позволяют выделить прототрофные и ауксотрофные штаммы.

*Минимальная среда* (minimal medium, defined medium) – питательная среда для культивирования бактерий и грибов, в которую входит минимальное количество соединений, необходимых для их роста и размножения (Арефьев, Лисовенко, 1995; Картель и др., 2011).

Обобщенный состав минимальной среды следующий (по Lodish et al., 2000):

- 1) источник углерода – глюкоза или глицерол;
- 2) источник азота – ионы аммония (например, в виде соли  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ ) или гистидин;
- 3) неорганические соли – источники ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ;
- 4) микроэлементы (trace elements).

К микроэлементам относят Mn, Mo, Zn, Cu, Co. В состав сред микроэлементы, как правило, не добавляют, так как потребность в них может быть удовлетворена за счет следовых примесей в солях макроэлементов (Поляк и др., 2008).

*Селективная среда* (selective medium) – среда для культивирования клеток или мицелиев одного определенного генотипа и не пригодная для роста клеток или мицелиев других генотипов (Арефьев, Лисовенко, 1995). Может содержать лимитирующий фактор – одно из веществ в количестве меньшем, чем это необходимо для роста микроорганизмов.

*Полная среда* (complete medium, rich medium) содержит все добавки, обеспечивающие рост и размножение любых мутантов с нарушениями синтеза метаболитов. В нее входят частично гидролизованные животные или растительные ткани или гидролизат казеина – для обеспечения микроорганизма аминокислотами, короткими пептидами, липидами; также включает дрожжевой экстракт, содержащий витамины, кофакторы ферментов, предшественники нуклеиновых кислот; остальные компоненты как в минимальной среде (Lodish et al., 2000; Картель и др., 2011). Полная среда.

*Прототрофы* (prototrophs) – в микробиологии – штаммы бактерий и грибов, способные синтезировать сложные вещества из ограниченного числа простых соединений, и потому растущие на минимальной среде. Еще их называют штаммами, способными к полному синтезу.

*Ауксотрофы* (auxotrophs) – микроорганизмы, которые в результате мутации утратили способность синтезировать определенные органические молекулы, необходимые для их роста (например, азотистые основания или витамины), и неспособные развиваться на минимальной среде. Жизненно важные соединения в этом случае называют *факторами роста*. Также ауксотрофами называют бактерии или грибы, которые приобрели, в сравнении с исходными формами, потребность в новых факторах роста. Причина ауксотрофности это, как правило, мутация в структурном гене (*мутация недостаточности*). Если же молекулярная причина зависимости по фактору роста не установлена, то говорят просто об *ауксотрофной мутации* (auxotrophic mutation). В их число входит образование ингибитора фермента, при неизменности гена биосинтеза фактора роста. Ауксотрофы часто образуются при обработке прототрофов мутагенами. Ауксотрофные штаммы обозначают тремя строчными начальными буквами латинского названия вещества, по которому они зависимы, или первой буквой латинского названия вещества, написанной заглавно; к обозначению добавляют знак «минус». Например, *lys<sup>-</sup>* – ауксотрофность по лизину.

При генно-инженерном создании или улучшении штаммов-продуцентов применяют *отбор по селективному маркеру* – выделение нужных генотипов из популяции, при котором требуемый генотип обеспечивает рост в определенных условиях (например, в присутствии антибиотика). *Селективный посев* (selective plating) – это метод выявления рекомбинантных микроорганизмов среди ауксотрофов, путем высева их на минимальную среду. При этом рекомбинация должна сопровождаться восстановлением аллели дикого типа и, соответственно, способности к синтезу соединения, которое отсутствует в минимальной среде. *Негативный отбор* (negative selection) – выделение из популяции микроорганизмов клеток-трансформантов, при котором их обнаружение базируется на потере одной или нескольких специфических функций. Например, вставка целевого гена в селективный маркерный ген инактивирует последний. Трансформанты выделяются по отсутствию экспрессии маркерного гена (Картель и др., 2011).

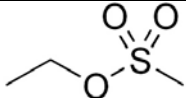
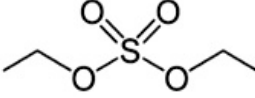
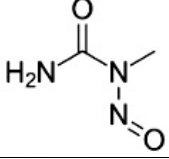
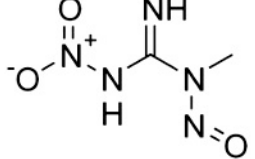
## Тема 5. ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Сам по себе искусственный отбор не является источником изменчивости, поэтому прибегают к процедуре мутагенеза. *Индукцированный* (искусственный, экспериментальный) мутагенез применяют для повышения генетического разнообразия в популяции вида. Биологическая основа мутагенеза – это внесение ошибок в матричный процесс репликации ДНК, в результате которого ДНК-фразы изменяются по отношению к родительским последовательностям, и в случае нелетальных мутаций могут привести к изменению фенотипа микроорганизмов.

В зависимости от природы факторов, мутагенез делится на химический и физический. В качестве химических мутагенов чаще используются вещества, перечисленные в **табл. 2**. Все они являются алкилирующими агентами, и добавляют метильные или этильные группы к азотистым основаниям в ДНК. В результате добавления метильной группы возникают мутации по типу транзиции: пара GC замещается на пару AT. При работе с этими веществами строго соблюдают технику безопасности (работают в перчатках и избегают вдыхания паров), так как они являются сильными канцерогенами и тератогенами.

В качестве физических мутагенов применяют ультрафиолетовое облучение или гамма-радиацию. Ультрафиолетовое облучение производят кварцевыми лампами. Гамма-облучение производят с помощью гамма-источников (радиоактивных металлов, например  $^{60}\text{Co}$ ) в специальных камерах, защищающих от излучения радиации во внешнюю среду. Мутагенезу с помощью ионизирующих излучений подвергают водные суспензии спор или вегетативных клеток.

**Таблица 2. Химические мутагены**

Название (рус., англ.)	Структурная формула
Этилметансульфонат (ЭМС; ethyl methanesulfonate)	
Диэтилсульфат (diethyl sulfate)	
Метилнитрозомочевина (МНМ; N-nitroso-N-methylurea)	
Метилнитрозогуанидин (methylnitrosoguanidine)	

Биологический материал, подвергаемый воздействию химического или физического мутагена (клетки бактерий, конидии грибов, обрывки мицелия) должен быть максимально дискретным и содержать минимальное количество ядер в каждой пропагуле, чтобы избежать последующей генетической разнородности ядер. Количество комков (конгломератов) в суспензии должно быть минимальным, так как мутация в одной из клеток конгломерата при его прорастании может быть утрачена. При мутации в одной из клеток грибного мицелия при прорастании, как правило, развивается *сектор* с измененной морфологией. Конгломераты в суспензии разбивают с помощью микробиологической качалки, и затем суспензию фильтруют через стерильный фильтр.

Химические мутагены добавляют к водным суспензиям биоматериала, соблюдая рН раствора, т.е. применяя буферную систему, и эффективную концентрацию мутагена. Кислотность среды зависит от систематической принадлежности продуцента. Например, метилнитрозогуанидин активен в отношении *Escherichia coli* и дрожжей при рН 6.0–6.5, а в отношении актиномицетов – при рН 9.0. Иногда химический мутаген более эффективен в газовой фазе. Например, для му-



тагенеза у актиномицетов и коринебактерий каплю диэтилсульфата наносят на стенку пробирки с культурой и инкубируют несколько часов в термостате. *Доза мутагена* для химических агентов – это его концентрация в суспензии и время экспозиции при определенной температуре. Доза для физических мутагенов – это количество единиц излучения для данного типа электромагнитных волн.

После экспозиции с химическим мутагеном биоматериал отмывают – осаждают центрифугированием, после чего помещают в буферный раствор с неоптимальным для мутагена рН или разводят в физиологическом растворе. После этого пропагулы продуцента можно посеять на агаризованной среде.

*Выживаемость микроорганизма* – это отношение числа изолированных колоний, выросших после обработки мутагеном, к их числу в контрольной суспензии, выраженное в процентах. В селекции используются дозы мутагена, обеспечивающие выживаемость от 0.1 до 80 %.

## Тема 6. ОТБОР МУТАНТОВ

После обработки мутагеном в распоряжении селекционера имеется популяция выживших микроорганизмов. Если взять за основу отбор по повышенному уровню продукции полезного вещества как количественному признаку, то существует два главных пути отбора: отбор случайных, или непредсказуемых мутаций и отбор среди мутантов с определенным фенотипом (ауксотрофных, резистентных к антиметаболиту и т.п.).

### *Отбор случайных мутаций*

Такой отбор ведется, когда не имеется данных о пути синтеза целевого продукта. Считается, что мутации контролируют признак повышенного синтеза продукта. *Ступенчатый отбор с применением мутагенов* ведется в следующем порядке:

1. Подготовленная к селекции культура (однородная популяция, полученная в ходе ступенчатого клонирования) обрабатывается мутагеном в нескольких дозах; могут применяться параллельно разные мутагены.

2. Из числа выживших колоний или мицелиев отсеивают не менее 100 штаммов (без специального выбора) для оценки уровня продукции вещества.

3. Уровни продукции после каждой дозы мутагена выражают в процентах к уровню продукции исходной культуры и распределяют в виде вариационного ряда.

4. Вариационные ряды для каждой дозы мутагена сравнивают с контрольным рядом (до обработки).

5. *Плюс-варианты*, у которых уровень продукции превышает  $X+2\sigma$ , служат материалом для дальнейшей селекции.

6. Дозы мутагена, давшие наибольшее количество плюс-вариантов, можно использовать в дальнейшем для обработки исходной культуры и увеличения популяции отобранных продуцентов.

7. Уровень продукции у отобранных плюс-вариантов проверяют после 2–3 пересевов на агаризованной среде.

8. Отбирают один штамм-мутант, уровень продукции у которого статистически достоверно превышает уровень продукции у исходного штамма. В ряде случаев такой отобранный мутант может иметь дополнительные признаки, например, сниженную споруляцию, утрату или приобретение пигментации.

На этом первый этап ступенчатого отбора с применением мутагенеза завершается, и отобранный мутант может быть проведен через аналогичные стадии (1–8) следующего этапа. Такая процедура позволяет «собрать» в геноме продуцента несколько мутаций, обеспечивающих суперпродукцию.

### ***Отбор среди мутантов с определенным фенотипом***

(1) *Отбор по морфологии.* Повышенная продукция целевого вещества может коррелировать с морфологическими изменениями для данного вида микроорганизма. Тогда производят отбор среди *морфологических мутантов*: малоспорующих, либо имеющих повышенную споруляцию, обесцвеченных, более интенсивно пигментированных, приобретших новый пигмент, имеющих иную форму колоний или очертания мицелия, имеющих иной размер колоний, имеющих иную текстуру мицелия или рельеф колонии. Для отбора продуцента необходимо измерить уровень продукции вещества у не менее чем 100 морфологически измененных штаммов.

(2) *Отбор среди ауксотрофных мутантов и ревертантов.* Мутации ауксотрофности позволяют блокировать образование ингибитора или кореспрессора синтеза желаемого продукта, перераспределить поток общих предшественников в разветвленных путях биосинтеза, или остановить дальнейшее превращение нужного продукта. Ауксотрофы выделяют из популяции, обработанной мутагенами методом реплик либо пенициллиновым методом.

*Метод реплик*, или отпечатков для выделения ауксотрофов, состоит в том, что готовят чашку Петри с агаризованной

полноценной средой, засеянной суспензией микроорганизма, обработанного мутагеном. После появления изолированных колоний на такой матричной чашке к поверхности среды прикасаются плоским репликатором – стерильной бархатной тканью, натянутой на диск, точно подходящий к внутреннему диаметру чашки Петри. С обратной стороны к диску крепится рукоятка. Вместо бархата можно пользоваться фильтровальной бумагой. Часть клеток из колоний отпечатываются на поверхность бархата. После этого диск прикладывают к поверхности среды в чашке или в чашках с селективными средами. Таким образом можно сделать до 10 отпечатков (реплик). Колонии, которые растут на неселективной среде, но не растут на какой-либо из селективных сред, рассматривают как мутанты-ауксотрофы. Для удобства учета положения колоний репликатор может быть игольчатым: на диске крепят короткие выступающие стержни (до 100 шт.) в определенном порядке. Диск слегка касается стерильной полноценной среды в чашке. После этого делают пересев из колоний, выросших после посева популяции, обработанной мутагеном, на места уколов в матричной чашке. Матричную чашку инкубируют до образования колоний, и переносят стерильным игольчатым репликатором часть клеток на чашки с селективными средами (Руководство к практическим занятиям по микробиологии ; под ред. Н.С. Егорова, 1995).

*Пенициллиновый метод обогащения мутантными клетками* применяется для бактерий, предложен Дэвисом и соавторами. Обогащение подразумевает увеличение доли мутантных клеток в популяции для более эффективного их поиска. Значительная часть немутантных клеток при этом элиминируется. Пенициллин подавляет синтез муреина клеточной стенки и вызывает гибель только активно растущих клеток. Если культуру, содержащую мутантные (например, ауксотрофные) и немутантные клетки, выращивать на минимальной среде, то в такой среде будут размножаться только немутантные клетки. После внесения в такую среду пенициллина происходит гибель только немутантных клеток, и популяция

обогащается мутантами. В оптимальных условиях можно достичь 1000-кратного обогащения культуры мутантами.

При использовании пенициллинового метода необходимо соблюдать следующие условия:

1) обрабатываемая пенициллином суспензия или культура должна содержать не более 100 клеток/мл. При использовании более густых суспензий продукты лизиса клеток, погибших от пенициллина, могут служить источниками ростовых факторов для мутантных клеток, в результате чего они начнут расти и также подвергаться действию пенициллина;

2) перед обработкой пенициллином бактерии должны быть проинкубированы в минимальной среде в течение времени, достаточного для 3–4 делений. За этот период происходит истощение эндогенных метаболитов в мутантных клетках, что предохраняет их от гибели в присутствии пенициллина (Руководство к практическим занятиям по микробиологии; под ред. Н.С. Егорова, 1995).

Первоначально у ауксотрофов определяют питательную потребность (или потребности) в факторах роста на разных селективных средах. Затем отсевают штаммы с той потребностью, которую хотел и получить. У них оценивают способность продуцировать желаемый продукт. Питательная среда для культивирования ауксотрофа-продуцента должна содержать фактор роста в ограниченном количестве, так как зачастую это соединение подавляет синтез нужного продукта.

Отбор прототрофных ревертантов среди ауксотрофов показал себя эффективным для продуцентов антибиотиков и ферментов. *Обратные мутации*, или *реверсии* (reverse mutations) – это мутации, восстанавливающие дикий или псевдодиккий тип гена, который был поврежден другой мутацией. Причиной обратной мутации может быть истинная реверсия или супрессорная мутация. Штаммы, претерпевшие обратную мутацию, называют ревертантами (Картель и др., 2011). Отбор ревертантов позволяет получить штаммы с восстановленной каталитической, но утраченной регуляторной функцией фермента, катализирующего синтез желаемого продук-

та. *Супрессорная мутация* (suppressor mutation) – мутация, которая полностью или частично восстанавливает признак, измененный в результате первичной мутации, затрагивая тот же ген или другие гены. Штаммами *псевдодикого типа* (pseudowild type) называют мутанты с фенотипом, не отличающимся от дикого, или немутантного штамма. Данный фенотип возникает при взаимодействии различных мутаций одного или нескольких генов (Тарантул, 2016).

Ревертанты к прототрофности получают путем высева клеток ауксотрофа по данному фактору роста по принципу газона на минимальную среду или среду, лишенную данного фактора роста. При этом отмечают появление ранних и поздних колоний. Желаемые ревертанты чаще находятся среди позднее появляющихся колоний – у них реверсия может не полностью восстановить прототрофный фенотип.

(3) *Отбор среди мутантов, резистентных к структурным аналогам метаболитов* (аналогорезистентных мутантов) широко применяется при выведении штаммов-продуцентов первичных метаболитов – аминокислот и азотистых оснований. Структурные аналоги метаболитов называют еще *анти-метаболитами*. Проникая в клетку, они подавляют ее рост путем нарушения синтеза нормальных метаболитов или образования макромолекул, которые не могут выполнять присущие им функции (Фирсов, 2006).

В качестве аналогов метаболитов подбирают те вещества, которые действуют на регуляторную систему биосинтеза подобно природному метаболиту, но клеткой по своему основному назначению использоваться не могут. Например, аналог аминокислоты, добавленный к минимальной среде, имитирует избыток этой аминокислоты на уровне систем биосинтеза у микроорганизма, но не может заменить эту аминокислоту в белках, и вызывает задержку или остановку роста.

*Примеры:* 5-метилтриптофан – это аналог триптофана, а S-(2-аминоэтил)-цистеин – это аналог лизина для бактерий.

Для получения аналогорезистентных мутантов исходную культуру засевают газоном на минимальную среду с анало-

гом метаболита в известной ингибирующей концентрации. Вместо газона вырастают отдельные колонии мутантов, преодолевших действие аналога. Часть из таких мутантов обладают способностью к сверхсинтезу желаемого метаболита, под который был подобран аналог.

Впоследствии мутанты клонируют, а у клонов проверяют способность к синтезу желаемого метаболита. Может быть использован метод *ауксотрофной тест-культуры*, когда мутанты, синтезирующие метаболит, подсевают к ауксотрофам по данному метаболиту, и обеспечивают «кормление» дефектных клеток и появление зон роста у них. Следующие этапы селекции могут включать клонирование продуцента на возрастающих концентрациях аналога метаболита. Для успешного отбора суперпродуцента необходима проверка на уровень синтеза метаболита для нескольких сотен аналогорезистентных клонов.

Наиболее типичными нарушениями у аналогорезистентных сверхпродуцентов является утрата чувствительности фермента (десенсбилизация) к ингибированию конечным продуктом, или нарушение механизма репрессии синтеза ферментов.

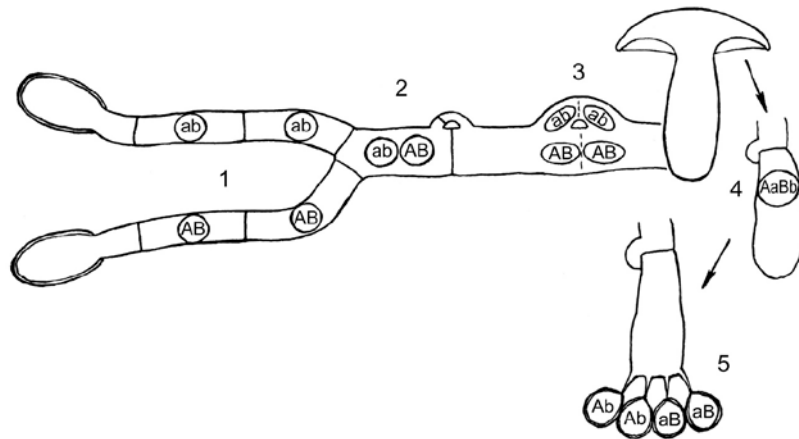
(4) *Отбор среди мутантов, устойчивых к антибиотикам*, помогает в селекции продуцентов антибиотиков. Для этого штаммы рассеивают в виде суспензии пропагул на чашки с агаризованной средой, содержащей разные концентрации антибиотиков. Антибиотик в среде способен вызвать у микроорганизмов большую изменчивость по признаку антибиотикообразования. Выжившие мицелии или колонии отсеивают для дальнейшей селекции с более высокими концентрациями антибиотика. В этом методе отбора применяют собственный антибиотик микроорганизма, либо чужой антибиотик.

## Тема 7. ГИБРИДИЗАЦИЯ

**Половая гибридизация.** Истинная гибридизация при селекции продуцентов применяется для грибных организмов. Значение гибридизации для селекции состоит в том, что образуются новые комбинации аллелей или генов у потомков по сравнению с родителями – т.е. происходит *генетическая рекомбинация* (genetic recombination). Основные механизмы генетической рекомбинации таковы: (1) появление нового сочетания аллелей вследствие вариантов расхождения сестринских хроматид при делении – *перекомбинация несвязанных генов*; (2) обмен участками гомологичных хромосом – *кроссинговер между сцепленными генами*; (3) *кроссинговер в пределах гена, или внутрицистронный* (Картель и др., 2011).

В основе половой гибридизации или *половой рекомбинации* лежит процесс слияния разнокачественных ядер и последующее мейотическое деление (рис. 4). Половая гибридизация у грибов отдела Basidiomycota достигается скрещиванием первичных (гомокариотических) мицелиев. Мицелии должны быть разнополыми, т.е. иметь различные половые аллели. В результате скрещивания экономически значимые признаки двух штаммов могут быть объединены (Генетические основы селекции грибов, 2005). Половая гибридизация в целях селекции может проводиться также на самостерильных, или гетероталлических грибах отделов Mucoromycota и Ascomycota.





**Рис. 4. Половая рекомбинация у базидиальных грибов при тетраполярном гетероталлизме: 1 – проросшие базидиоспоры дают первичные мицелии, или гомокарионы; 2 – гомокарионы с подходящим сочетанием половых аллелей сливаются, формируя дикарион (вторичный мицелий); 3 – пряжки на гифах обеспечивают правильное распределение ядер при делении клеток; 4 – диплоидное ядро в базидии; 5 – один из вариантов распределения аллелей в базидиоспорах после мейоза (по Мюллер и Лёффлер, 1995, с изменениями)**

Для половой рекомбинации у базидиомицетов необходимо сначала произвести отбор и создать коллекцию культур первичных мицелиев, или гомокарионов, принадлежащих к разным полам. Для этого получают проростки изолированных базидиоспор. Для разделения базидиоспор готовят либо их разведенную суспензию, которую рассеивают шпателем по поверхности агаризованной питательной среды, либо применяют метод посева базидиоспор прямо из гимения. В последнем случае плодовые тела со зрелым гимением приклеивают вазелином на крышке чашки Петри, гименофором вниз, и помещают на очень короткое время (1–2 с) над дном чашки Петри со стерильной питательной средой. В результате некоторое количество базидиоспор отделяются от базидий и попадают на поверхность агара. Затем чашку со средой накрывают стерильной крышкой и инкубируют при подходящей для развития гриба температуре. Посевы базидиоспор проверяют каждый день под бинокулярной лупой, и видимые обособленные проростки пересеивают иглой на отдельные чашки, вырезая вместе с маленьким фрагментом агара. Проросшие базидиоспоры дают первичный, или гомокариотический, мицелий. Процедура скрещивания состоит в посеве

двух первичных мицелиев в противокультуре – на некотором расстоянии на одной чашке Петри. В случае подходящего сочетания половых аллелей в зоне встречи мицелиев при их росте образуется вторичный мицелий – гетерокарион, характеризующийся более плотным и «высоким» ростом над поверхностью среды (рис. 5). Признаками вторичного мицелия являются пряжки – дугообразные перемычки при каждой септе на гифах. Вторичный мицелий пересекают в субкультуру и проверяют наличие у него сочетания хозяйственно полезных признаков.



**Рис. 5. Скрещивание у базидиальных грибов на плотной питательной среде (на примере *Pleurotus* sp. по Gupta et al., 2011)**

**Парасексуальная рекомбинация у грибов.** Термином *парасексуальность* (parasexuality) обозначают процесс образования клетки или целого таллома более чем от одной родительской клетки в отсутствие стандартного мейоза и оплодотворения. Еще парасексуальность называют *вегетативной гибридизацией*, или *парасексуальным процессом*. Рекомбинация при этом происходит при митотическом делении.

Для вегетативной гибридизации у грибов требуется слияние дикариотических мицелиев или протопластов. В результате такой гибридизации полезные признаки могут быть переданы от родственных видов грибов, когда половая гибридизация между ними невозможна. Также парасексуальный процесс позволяет получить гибриды автофертильных (самофертильных, унипарентальных) видов, т.е. не нуждающихся

ся в другом мицелии при обычном половом процессе (Генетические основы селекции грибов, 2005).

У мицелиальных грибов парасексуальная рекомбинация, или парасексуальный цикл (parasexual cycle) имеет место как в природе, так и в эксперименте. Открыт G. Pontecorvo и соавторами в 1953 г. Он включает деление ядер гетерокариотического гаплоидного мицелия и слияние части из них, приводящее к тому, что в клетках присутствуют и гаплоидные, и диплоидные ядра. Последующие митозы могут привести к рекомбинации аллелей в результате соматического кроссинговера. Новые генетические комбинации появляются в результате гаплоидизации диплоидных ядер, без мейотического процесса. Этот цикл был в наибольшей степени изучен на примере *Aspergillus nidulans* (Kirk et al., 2008). Иными словами, парасексуальная рекомбинация у грибов – это слияние генетически разных гаплоидных ядер в клетках-гетерокарионах, с образованием диплоидного ядра, а затем с образованием дочерних гаплоидных ядер, но без мейоза.

*Соматический кроссинговер* (somatic crossing over) – это обмен участками хроматид в результате перекреста между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом при митозе. Поскольку гомологичные хромосомы в митозе не конъюгируют, такой кроссинговер наблюдается как исключение (Картель и др., 2011). В мицелии соматический кроссинговер может привести к образованию химер – частей организма с иным фенотипом, содержащих кроссоверные хромосомы.

***Парасексуальная рекомбинация у бактерий*** происходит в результате конъюгации, трансдукции и трансформации. *Конъюгация* – передача новых генов от одной бактериальной клетки к другой (в том числе между разными видами бактерий) вместе с половой плазмидой в результате тесного контакта клеток. *Трансдукция* – перенос от бактерии к бактерии фрагмента бактериальной хромосомы, упакованной в капсид бактериофага вместо фагового генома.

*Трансформация* – включение в состав бактериальной хромосомы чужеродной ДНК, которая поступает в особые

восприимчивые бактериальные клетки из окружающего раствора (Картель и др., 2011). Все эти три процесса являются инструментами для создания штаммов бактерий-продуцентов, дополняя традиционную селекцию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алиханян, С.И. Селекция промышленных микроорганизмов / С.И. Алиханян. – М. : Наука, 1968. – 392 с.
2. Арефьев, В.А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / В.А. Арефьев, Л.А. Лисовенко. – М. : Изд-во ВНИРО, 1995. – 407 с.
3. Биологический энциклопедический словарь / М.С. Гиляров (гл. ред.) [и др.]. – М. : Советская энциклопедия, 1986. – 831 с.
4. Генетические основы селекции грибов // В кн. : Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. – М. : Academia, 2005. – С. 218–252.
5. Дебабов, В.Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. Биотехнология : В 8 кн. – Кн. 2 ; под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – М. : Высшая школа, 1988. – 208 с.
6. Дмитриева, В.А. Русско-английский словарь терминов по микробиологии / В.А. Дмитриева, В.В. Дмитриев. – М. : Наука, 1991. – 248 с.
7. Жданова, Н.И. Селекция промышленных микроорганизмов – продуцентов аминокислот : Обзор / Н.И. Жданова ; ОНТИТЭИ микробиопром. – М., 1973. – 47 с.
8. Жданова, Н.И. Селекция микроорганизмов – продуцентов практически важных веществ // В кн. : Промышленная микробиология ; под общ. ред. Н.С. Егорова. – М. : Высшая школа, 1989. – С. 77–95.
9. Жданова, Н.И. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов – продуцентов аминокислот [Сер. II «Селекция и генетика пром. микроорганизмов». Обзор. информ.] / Н.И. Жданова, М.М. Гусятинер. – М. : ВНИИСЭНТИ, 1985. – 64 с.
10. Жукова, Р.А. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов / Р.А. Жукова, А.Д. Коммунарская, М.И.

Пронина [и др.]. ; отв. ред. И.А. Захаров. – Л. : Медицина, 1978. – 160 с.

11.Картель, Н.А. Генетика: Энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск : Белорусская наука, 2011. – 992 с.

12.Коваленко, С.П. Химические факторы в селекции продуцентов микробных белков / С.П. Коваленко. – Минск : Наука и техника, 1980. – 136 с.

13.Коновалов, С.А. Селекция микроорганизмов – продуцентов ферментов : Обзор / С.А. Коновалов ; глав. упр. микробиол. пром-сти при Совете Министров СССР. – М., 1970. – 185 с.

14.Косиков, К.В. Генетика дрожжей и методы селекции дрожжевых культур / К.В. Косиков. – М. : Изд-во АН СССР, 1954. – 326 с.

15.Косиков, К.В. Генетические методы селекции дрожжей : гибридизация, полиплоидия / К.В. Косиков. – М. : Наука, 1979. – 116 с.

16.Криг, Н. Получение накопительных и чистых культур // В кн.: Методы общей бактериологии ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. В 3-х т. – Т. 1. – М. : Мир, 1983. – С. 277–355.

17.Левитин, М.М. Изучение генетики грибов // В кн.: Билай, В.И. (отв. ред.) [и др.]. Методы экспериментальной микологии : Справочник. – Киев : Наукова думка, 1982. – С. 345–357.

18.Мавлани, М.И. Селекция промышленных рас дрожжей / М.И. Мавлани. – Ташкент : Фан, 1977. – 188 с.

19.Мюллер, Э. Микология / Э. Мюллер, В. Лёффлер. – М. : Мир, 1995. – 343 с.

20.Полупанов, В.С. Внеклеточные белки микроорганизмов / В.С. Полупанов. – Минск : Наука и техника, 1986. – 54 с.

21.Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2008. – 352 с.

- 22.Руководство к практическим занятиям по микробиологии ; под ред. Н.С. Егорова. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
- 23.Тарантул, В.З. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. Русско-английский. – Т. 2 / В.З. Тарантул. – М. : Языки славянской культуры, 2016. – 1040 с.
- 24.Фирсов, Н.Н. Микробиология : словарь терминов / Н.Н. Фирсов. – М. : Дрофа, 2006. – 256 с.
- 25.Шигаева, М.Х. Селекция дрожжей / М.Х. Шигаева. – Алма-Ата : Наука, 1975. – 150 с.
- 26.Cléménçon, H. Cytology and plectology of the Hymenomycetes / H. Cléménçon [Bibl. Mycol. Vol. 199]. – Berlin, Stuttgart: J. Cramer, 2004. – 488 p.
- 27.Fox, S.R. The biosynthesis of oxylipins of linoleic and arachidonic acids by the sewage fungus *Leptomitus lacteus*, including the identification of 8R-hydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid / S.R. Fox, A. Akpinar, A.A. Prabhune, J. Friend, C. Ratledge // *Lipids*. – 2000. – Vol. 35, is. 1. – P. 23–30.
- 28.Gupta, B. Molecular characterization and mating type analysis of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) using single basidiospores for strain improvement / B. Gupta, B.P.N. Reddy, A.S. Kotasthane // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 27, No. 1. – P. 1–9.
- 29.Kerr, R.G. *In vitro* biosynthetic studies of the bryostatins, anticancer agents from the marine bryozoan *Bugula neritina* / R.G. Kerr, J. Lawry, K.A. Gush // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – P. 8305–8308.
- 30.Kirk, P.M. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10th edn / P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers (eds). – Wallingford: CABI, 2008. – xi + 771 p.
- 31.Lodish, H. Molecular cell biology. 4th edn / H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. – New York: Freeman & Co., 2000. – 1084 p.
- 32.Morais, M.G. de. Biologically active metabolites synthesized by microalgae / M.G. de Morais, B. da S. Vaz, E.G. de Morais, J.A.V. Costa // *Biomed. Res. Int.* – 2015 : 835761.

33. Odum, E.P. Basic ecology / E.P. Odum. – New York : Saunders College Publishing, 1983. – 613 p.

34. Ruggiero, M.A. A higher level classification of all living organisms / M.A. Ruggiero, D.P. Gordon, T.M. Orrell, N. Bailly, T. Bourgoin, R.C. Brusca, T. Cavalier-Smith, M.D. Guiry, P.M. Kirk // PLoS ONE. – 2015. – Vol.10, No. 4: e0119248.

35. Ryckebosch, E. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil / E. Ryckebosch, C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, K. Goiris, K. Muylaert, I. Foubert // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 160. – P. 393–400.

36. Schallmey, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50, No. 1. – P. 1–17.

37. Schiraldi, C. Perspectives on biotechnological applications of archaea / C. Schiraldi, M. Giuliano, M. De Rosa // Archaea. – 2002. – Vol. 1, No. 2. – P. 75–86.

38. Schuster, E. On the safety of *Aspergillus niger* – a review / E. Schuster, N. Dunn-Coleman, J.C. Frisvad, P.W. Van Dijck // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 59, No. 4–5. – P. 426–435.

39. Simpson, A.G.B. The real 'kingdoms' of eukaryotes / A.G.B. Simpson, A.J. Roger // Current Biology. – 2004. – Vol. 14, No. 17 : R693–R696.

40. Sukhareva-Buell, N.N. Biologically active substances of Protozoa / N.N. Sukhareva-Buell. – Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2003.

Takeyama, H. Production of antioxidant vitamins, beta-carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z / H. Takeyama, A. Kanamaru, Y. Yoshino, H. Kakuta, Y. Kawamura, T. Matsunaga // Biotechnol. Bioeng. – 1997. – Vol. 53, No. 2. – P. 185–190.

41. Zaid, A. Glossary of biotechnology and genetic engineering [FAO Research and Technology Paper 7] / A. Zaid, H.G. Hughes, E. Porceddu, F. Nicholas. – Rome : FAO, 1999. – 250 p.



*Учебное издание*

Юрченко Евгений Олегович

**СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск *П.Б. Пигаль*

Редактор *Митянок Е.М.*

Подписано в печать 21.02.2017 г. Формат 60x84/8.  
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.  
Усл. печ. л. 2,41. Уч.-изд. л. 1,43.  
Тираж 44 экз. Заказ №.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе  
Полесского государственного университета.  
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.