

Využitie mendelistických zákonitostí pri šľachtení priemyslových mikroorganizmov so zvýšeným aspektom na kvasinky

RNDr. VLASTA KOVÁČOVÁ, CSC., Katedra molekulárnej biológie a genetiky PrF UK, Bratislava

Kľúčová slová: introdukcia, párovací typ, prírodný výber, homotalické a heterotalické kmene, umelý výber, mutačné šľachtenie, mutanty rovnakoalelické a rôznoalelické, komplementárna interakcia, polyploidia

Genetika kvasiniek sa začala rozvíjať okolo r. 1930, vynutená naliehavými požiadavkami potravinárskeho priemyslu vylepšiť základné produkčné kmene. Centrom výskumu stala sa dánska skupina pracovníkov okolo O. Wingeho a C. Robertsovej. Nadväzovali na selekcionársku prácu od dôb E. Ch. Hansena, ktorý už r. 1883 získaval selekciou buniek v monocultúrach zlepšené pivovarnícke kmene. V priebehu sto rokov medzinárodnej práce pri hľadaní, zušľachťovaní a tvorení nových kmeňov pribúdali nové techniky, manipulácie, nielen na úrovni chromozómovej, ale i na úrovni molekúl DNA. Pôvodné metódy ostávajú však aj dnes ako základné a na ne sa nadstavujú alebo obmieňajú metódy nové.

Prvá najstaršia metóda je **introdukcia**. Predstavuje získavanie najvýhodnejších kmeňov z prírody pre praktické využitie. Musí i dnes predchádzať selekcii pri obhacovaní praxe o nové typy. Súčasťou introdukcie je poznanie biológie a pre genetika hlavne biológie rozmnožovania sledovaného typu. S mnohými významnými prírodnými druhmi, ktorých vynikajúce vlastnosti sú nám dobre známe, nemôžeme pracovať geneticky preto, lebo nepoznáme dobre ich spôsob rozmnožovania. Ako príklad nech nám slúži *Candida lipolytica*, u ktorej sa dlho poznal len jeden párovací typ. A keď sa spoznal i druhý, ešte stále nie sú vypracované dokonalé metódy hromadného získavania zygôt a teda i budúcich hybridov. Iný príklad je z oblasti vínnych kvasiniek. Všetky kmene, s ktorými sme začali pracovať, ukázali sa byť homotalické. Majú nenarušený pohlavný cyklus rozmnožovania, prebieha u nich meióza, tvoria pohlavné spóry, ale tieto po niekoľkých mitotických deleniach spolu spávajú. Pre ich hybridizáciu musí sa používať náročná hybridizačná technika. Po izolácii spóry jedného rodičovského kmeňa treba ihneď prikladať k nej vyizolovanú spóru alebo haploidnú bunku druhého rodičovského kmeňa, aby splynuli, kým nestačia vytvoriť vlastné dcérske bunky.

Selekcia je ďalší spôsob pre získavanie nových kmeňov. Má ohraničenú pôsobnosť. Vyberá to, čo už bolo vytvorené, nie je schopná viesť do génomu novú informáciu. Pri selekcii mikroorganizmov používajú sa dve základné metódy. 1. Využitie prírodného výberu foriem, ktoré sú prakticky cenné. 2. Umelý výber prirodzenou premenlivosťou vznikajúcich foriem a umelý výber zmenených foriem indukovaných mutagénmi.

Podstata prvej metódy tkvie v tom, že sa šľachtiteľ snaží získať takú formu mikroorganizmu, ktorá bude v určitom prostredí dominovať, pretože je pre dané prostredie výhodnejšia. K dosiahnutiu cieľa treba vytvoriť pre kultiváciu presne stanovené podmienky a keď sa objaví spontánna mutácia, táto v pre ňu výhodných podmienkach vytlačí premnožením z populácie pôvodnú formu. Pre vyjasnenie mechanizmov zmeny vlastností sú potrebné špeciálne analýzy mikrobiálnych populácií. Často sa používa fluktuálny test a odtlačková metóda. Tento spôsob práce používa sa s výhodou vtedy, keď treba získať rôzne varianty mikroorganizmov, ktoré rastú na novej kultivačnej pôde, sú odolnejšie ku škodlivým faktorom, sú prispôbivejšie k zmenenej kultivačnej teplote atď.

Ak je pre šľachtiteľa nevyhnutná vlastnosť, ktorá je

z biologického hľadiska daného kmeňa nevýhodná, musí robiť umelý výber foriem vznikajúcich prirodzenou premenlivosťou, čiže umelý výber spontánnych mutácií. Robí sa tak testovaním mnohých monocultátov. Test musí byť čo najjednoduchší, aby sa v krátkom čase mohlo otestovať čo najviac monocultúr. Táto metóda je výhodná vtedy, keď východzia kultúra je v hľadanom znaku zjavne heterogenná. Heterogennosť kultúry sa zisťuje opakovaným testovaním vybranej vlastnosti na približne sto monocultúrach, získaných riedkym výsevom buniek na pevnú pôdu. Súčasne sa aspoň desaťkrát otestuje pôvodná populácia buniek základnej kultúry. Ak sú výsledky v monocultúrach pri opakovaných základných populáciách rozdielne, je výhodné robiť umelý výber.

Umelý výber zmenených foriem vytvorených zásahom mutagénov do molekúl DNA na rôznej úrovni nazýva sa mutačné šľachtenie. Mutagénmi zväčšujeme genotypovú variabilitu východzieho materiálu. Nové mutácie nemusia byť hneď využiteľné v praxi. Môžu byť len východiskovým bodom pre ďalšie šľachtenie alebo môžu predstavovať pomocné značkovacie gény. Napríklad pri ťažko krížeľných formách, u ktorých nie je jasné či došlo ku kríženiu, dobre dokázateľný značkovací gén jedného rodiča a iný značkovací gén druhého rodiča po splnutí v hybridovi nás presvedčia, že došlo skutočne ku spojeniu genomov. Vari najvýraznejšiu odozvu našlo mutačné šľachtenie pri selekčnej práci na zvýšenie produkcie antibiotík u *Penicillium chrysogenum*, *Actinomyces streptomycini*, *A. subtropicus*, *A. erythreus* atď. Súčasne najlepšie kmene produkujú viac ako 55krát penicilínu než pôvodný základný izolát. Tento stav bolo možné dosiahnuť preto, lebo pri syntéze penicilínu ako sekundárneho metabolitu spolupôsobí 10–30 rôznych génov, pravdepodobne s polymerickým podkladom. Je zrejmé, že po opakovanom mutovaní rôznymi mutagénmi a následnou tzv. stupňovitou selekciou najvýkonnejších subklonov zasahujú sa rôzne lokusy, ktoré spolupôsobia i duplicitným spôsobom. Napriek tomu, že parasexuálny proces rozmnožovania sa neukázal byť dostatočne rýchly pre vytváranie produktívnejších typov, predsa by bolo zaujímavé a prospešné zistiť, ako sú lokalizované a v akom genetickom vzťahu sú pôsobiace desiatky génov.

Rôzne organizmy reagujú na ten istý mutagén rôzne. Aby sa zistila citlivosť kmeňa na daný mutagén, selektuje sa po mutagenéze najprv určitý ľahko testovateľný znak a až potom sa použije tá istá dávka mutagénu na docielenie vybranej vlastnosti. Napríklad výborný producent vitamínu B₁₂, *Actinomyces olivaceus*, sa vyselektoval tak, že sa po ovplyvnení s UV, X žiarením a etylénimonom zisťovala najprv citlivosť voči fágom. Najvýhodnejší sa ukázal etylénimonom. Po ovplyvnení sa vybralo 500 subklonov a až tieto sa testovali na produkciu vitamínu B₁₂. Zaujímavé je poznanie, že na vyvolávanie mutácií so zvýšenou produkciou kvantitatívnych vlastností sú vhodnejšie nižšie dózy ako pre vyvolávanie vlastností morfológických.

Mnoho urobila mutačná genetika pre poznanie biosyntetických a bioenergetických ciest pomocou biochemických mutantov. Za rôzne stupne biosyntézy látok zodpo-

vedajú rôzne gény. Ak sa získa mutant s pozmeneným génom pre určitý stupeň biosyntézy, bude tento syntetizovať medziprodukt len do toho stupňa, pre ktorý bol gén porušený.

Ak sa spozná syntetizačná cesta daného produktu, môžu sa selektovať i mutanty iného genotypu so zvýšenou produkciou. Známy je príklad so zvýšenou produkciou lyzínu na kmeni *Corynebacterium glutamicum*. Izolovali sa mutanty neschopné syntetizovať homoserín. Homoserín je prekursor metionínu, treonínu a cysteínu. Vzniká zo semialdehydu kyseliny asparágovej, ktorý je prekursorom lyzínu. Genetickou blokádu je znemožnená premena semialdehydu na homoserín a tak všetok semialdehyd sa využije na biosyntézu lyzínu. Chýbajúci metionín a treonín vyberá si organizmus zo živnej pôdy.

Niekedy sa získavajú viaceré recesívne mutácie s tým istým poškodeným fenotypom, o ktorých sa nevie, či majú postihnutý ten istý lokus, teda či sú totožné, rovnako alelické, alebo či postihnuté gény reprezentujú odlišné lokusy s rovnakým fenotypickým efektom. Ak sú mutanty rovnakoalelické, bude mať hybrid po skrížení taký istý nezmenený fenotyp ako rodičia a takisto i potomkovia rozmnožením pohlavným spôsobom. Ak sú mutanty rôznoalelické, fenotyp hybridu bude štandardný, nepoškodený, pretože gény sa budú vo funkcii dopĺňať. Potomstvo klónov vzniklých z pohlavných spór bude vyštiepovať typy štandardné i mutantné. Napríklad po skrížení dvoch jadrových rôznoalelických respiračno-deficitných mutantov kvasiniek bude hybrid respiračne sufficientný, čiže dýchajúci, a pohlavné potomstvo bude vyštiepovať typy dýchajúce i nedýchajúce.

Na tomto princípe testu alelizmu na selektívnych pôdach za použitia menej náročnej hromadnej izolácie spór z askov [1, 2] možno určovať i iné typy dedičnosti produkčne významných vlastností, napr. komplementárnu interakciu génov (tab. 1). Tieto metódy možno zaradiť i do hybridizačného šľachtenia.

Hybridizácia je pri šľachtení mikroorganizmov výhodná vtedy, keď máme známy, predchádzajúcimi metódami získaný materiál, ktorý chceme spojiť v jednom genome, alebo naopak, heterogénny materiál chceme meiotickým štiepením rekombinovať alebo rozložiť na viaceré nové užitočné typy. Ak sa dve individuá odlišujú n počtom génov alebo častí génov, potom kombinácia ich genomov vedie k vytvoreniu 2^n genotypov. Kríženie dvoch kmeňov mikroorganizmov, ktorých molekuly DNA sa odlišujú len 12 párami báz, rozloženými po celom genome, medzi miliardami iných párov, dá v potomstve 2^{12} , t. j. skoro 5 000 genotypov. Obyčajne sa rodičovské bunky odlišujú ešte viac, preto pri ich skrížení získava sa astronomický počet nových kombinácií. Hoci všetky mikroorganizmy majú možnosť vymieňať a kombinovať gény, máme pomerne málo príkladov zo šľachtenia, kedy sa získali priemyslovo významné kultúry, s výnimkou kvasiniek s heterotalickými párovacími typmi. Úspešne sa krížia hlavne príbuzné kmene, alebo druhy, ktoré sú i genotypicky príbuzné, čiže pomerne rovnaké. Vzdialenejšie formy sa nechcú krížiť alebo sa krížia málo za presne definovaných podmienok, ktoré sa musia zistiť.

Pri priemyselne významných formách pivovarníckych, pekárenských kvasiniek stretávame sa s triploidiou a hlavne s aneuploidiou, rôznym počtom chromozómov v sade, ktoré vytvárajú ťažkosti pri udržaní stálosti kmeňa pri pohlavnom rozmnožovaní a genetickej analýze vybranej vlastnosti. V praxi sa rozlišuje polyploidia podľa rôznych fenotypických kritérií. Bunky triploidov s tromi sadami chromozómov bývajú väčšie ako diploidné, tieto sú zas väčšie ako haploidné s jednou sadou chromozómov. Bolo by ideálne, napr. pre selekciu kŕmnych kvasiniek, keby triploidy boli stále a rýchlo sa mitoticky rozmnožovali, pretože by sa takto zlepšovaním biomasy zvyšoval i obsah proteínov. Meiotické delenie triploidných buniek je pozmenené a nerovnomerné. Okrem haploidných tvoria i sterilné, nekrížiace sa dip-

Tabuľka 1. Mendelistické štiepenie pri hromadnej analýze populácie spór

Typ dedičnosti	Fenotyp			
	1. rodič	2. rodič	Hybrid	Štiepenie populácie spór
Monohybridizmus $\begin{array}{c} A \times a \\ \hline A \\ \hline a \end{array}$	A	a	A	1 A : 1 a
Dihybridizmus $\begin{array}{c} A B \times a b \\ \hline A B \\ \hline a b \end{array}$	AB	ab	AB	1 AB; ab : 1 Ab; aB
Dihybridizmus s väzbou $\begin{array}{c} A B \times a b \\ \hline A B \\ \hline a b \end{array}$	AB	ab	AB	viacej AB; ab : menej Ab; aB rodičovské : rekombinanty po crossingover
Interakcia 2 génov na podklade komplementarity $\begin{array}{c} A b \times a B \\ \hline A b \\ \hline a B \end{array}$	Ab nefunkčný	aB nefunkčný	AB funkčný	1 AB : 3ab; Ab; aB funkčný : nefunkčné
Interakcia 2 génov na poklade kumulatívneho pôsobenia (polyméria) $\begin{array}{c} A b \times a B \\ \hline A b \\ \hline a B \end{array}$	Ab stredná intenzita	aB stredná	AB silná	1 AB : 2 AB; aB : 1 ab silná : stredná : slabá, resp. nijaká

A — dominantný gén; a — recesívny gén; $\frac{A}{a}$ — gény lokalizované v rozdielnych chromozómoch; $\frac{A}{A}$ — gény lokalizované v tom istom chromozóme.

loidné spóry. Iné spóry sa síce križia, ale ich potomci, pretože sú tetraploidní, so štyrmi sadami chromozómov, tvoria zas netypicky sa štiepiace potomstvo. Hromadnou izoláciou spór a jednoduchým testom sporulácie možno ľahko zistiť, či kultúry, ktoré mienime použiť, sú polyploidné, s dvomi sadami chromozómov, alebo máme haploidný monosporický izolát [1].

Pri hromadnej analýze populácie spór hybridu možno na testovacích pôdach zistiť, či sledovaná vlastnosť je podmienená jedným lokusom alebo viacerými lokusmi, či ide o dominantný alebo recesívny gén, či sledované gény dvoch vlastností ležia v tom istom chromozóme, a teda sa budú dediť väčšinou pohromade, alebo či dva gény spolupôsobia pri vytváraní jednej vlastnosti. Podľa štiepenia v potomstve možno zistiť i typ spolupôsobenia, čiže interakcie génov (tab. 1). Výsledky hromadnej analýzy pohlavných spór sú smerodajné len vtedy, ak je kľúčová spór spoš 75 %.

Ako vidno z tabuľky, pri sledovaní dedičnosti jednej vlastnosti (monohybridizmus) bude sa v hybridovi prejavovať dominantná vlastnosť a populácia klonov z mitoticky namnožených spór bude štiepiť oba rodičovské typy v približne rovnakom pomere.

Pri súčasnom sledovaní dedičnosti dvoch vlastností (dihybridizmus) hybrid bude mať fenotyp dominantných vlastností. U potomkov sa budú vyskytovať približne v rovnakom pomere pôvodné rodičovské kombinácie fenotypov a kombinovaných fenotypov vtedy, ak sledované gény ležia v rozdielnych chromozómoch. Ak sú gény lokalizované v tom istom chromozóme, hybrid bude mať fenotyp dominantných vlastností rodičov, ale v potomstve vo väčšine prípadov budú gény v rodičovských kombináciách. Len po crossing-over, v tzv. neúplnej väzbe, vzniknú rekombinované nové fenotypy, ale v omnoho menšom počte ako rodičovské.

V prípade, že sa na vytvorení fenotypu podieľajú dva gény, dedičnosť sa bude prejavovať podľa toho, v akom hierarchickom funkčnom postavení tieto dva gény sú. Pri tzv. komplementárnej interakcii po skrížení dvoch nefunkčných alebo slabofunkčných fenotypov vznikne hybridný komplementárny funkčný diploid s dvomi doplnujúcimi sa vo funkcii dominantnými génmi. Keďže gény sú lokalizované v samostatných chromozómoch, v populácii klonov spórických izolátov môžeme pozorovať v menšom počte fenotypy fungujúce a vo väčšom počte kombinované nefungujúce, prípadne slabofungujúce fenotypy.

Súhrnne možno povedať, že hybridizácia zohrala významnú úlohu pri vytvorení produkčných kmeňov pekárenských, pivovarníckych i liehovarníckych kvasiniek. V súčasnosti je snahou premôcť ťažšiu križiteľnosť vzdialených, alebo ťažko sa križiacich genotypov využívaním techniky spĺývania protoplastov dvoch buniek bez bunkovej steny kvasiniek, ale i kvasinkového protoplastu s bakteriálnym protoplastom. U hybridných protoplastov možno dosiahnuť vytvorenie novej bunkovej steny. Z hľadiska selekcionárskeho je dôležité to, aby v bunke schopnej sa naďalej rozmnožovať mitoticky množili sa i nové gény, hoci i v podobe heterokaryónov. Z hľadiska genetického je však dôležitejšie to, aby sa tieto nové gény integrovali do spoločného génomu, aby v ňom aj ostali a synchronne sa množili. V prípade vzdialených

hybridov však práve v tomto momente dochádza ku ťažkostiam nestálosti génomu, ako je to pri vzdialenej pohľavnej hybridizácii.

V poslednej dobe na prekonanie spomínaných bariér využívajú sa ako nadstavba doterajších metód poznatky molekularnej genetiky v podobe génových manipulácií.

Je preto samozrejmé, že je nutné podporovať rozvoj všetkých doterajších spôsobov, vrátane získavania a udržiavania prírodných i syntetických kmeňov v malých i celonárodných zbierkach, pretože predstavujú cenné bohatstvo genofondov nielen štátneho ale aj svetového významu.

Literatúra

- [1] KOVÁČOVÁ, V.: Genetická analýza mikroorganizmov. I. Tetradová analýza kvasiniek. 1983 Univerzita Komenského, Bratislava.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky a kvasinkové mikroorganizmy. 1982 Alfa, Bratislava.

Kováčová, V.: Využitie mendelistických zákonitostí pri šľachtení priemyslových mikroorganizmov so zvýšeným aspektom na kvasinky. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 149—151.

Popisujú sa šľachtiteľské metódy používané pri tvorení nových foriem priemyslových mikroorganizmov: introdukcia, využitie prírodného výberu i výberu indukovaných mutácií, hybridizácia, spĺyvanie protoplastov a génové manipulácie.

Tabuľka udáva fenolytické vzťahy pri hromadnej izolácii populácie pohlavných spór. Autorka zastáva názor, že všetky uvádzané metódy majú i v dnešnej dobe rovnaký význam pre úspešné získavanie užitočných foriem mikroorganizmov.

Ковачова, В.: Использование менделистических закономерностей в селекции промышленных микроорганизмов с большим аспектом на дрожжи. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 149—151.

Разбираются методики селекции, которые используются для выделения новых форм промышленных микроорганизмов; интродукция, использование естественного отбора и отбора индуцированных мутаций, гибридизация, слияние протопластов и генные манипуляции.

В таблице представлены фенотипические соотношения в анализе случайной выборки спор. Авторка считает, что и к настоящему времени все примененные методики имеют вместе такое же значение для успешной селекции полезных форм микроорганизмов.

Kováčová, V.: The employment of Mendel's laws in improvement of industrial microorganisms with the emphasis on yeasts. Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 149—151.

Methods used for preparation of new forms of industrial microorganisms are described: introduction, the employment of natural selection and of selection of induced mutations, hybridization, protoplast fusion and gene manipulations. The Table shows phenotypic relationships at random spore analysis. The author states that all the methods hitherto known are of equal importance in selection of new forms of microorganisms.

Kováčová, V.: Ausnutzung mendelistischer Gesetzmäßigkeiten bei der Züchtung industrieller Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung der Hefen. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 149—151.

Es werden die Züchtungsmethoden beschrieben, die bei der Bildung neuer Formen von industriellen Mikroorganismen appliziert werden: Introdution, Ausnutzung der Natursauslese und der Auswahl der induzierten Mutationen, Hybridisation, Verschmelzung der Protoplasten und Genmanipulationen. Die phenotypische Beziehungen bei der Massenisolierung der Population geschlechtlicher Sporen werden tabellarisch dargestellt. Die Autorin vertritt die Ansicht, daß alle erwähnte Methoden gegenwärtig gleichbedeutend für die erfolgreiche Gewinnung nützlicher Mikroorganismen-Formen sind.