

Молекулярная селекция уникальных генотипов осины и березы для плантационного лесовыращивания.

Группа лесной биотехнологии ФИБХ РАН

Докладчик:

Шестибратов

Константин Александрович, к.б.н.





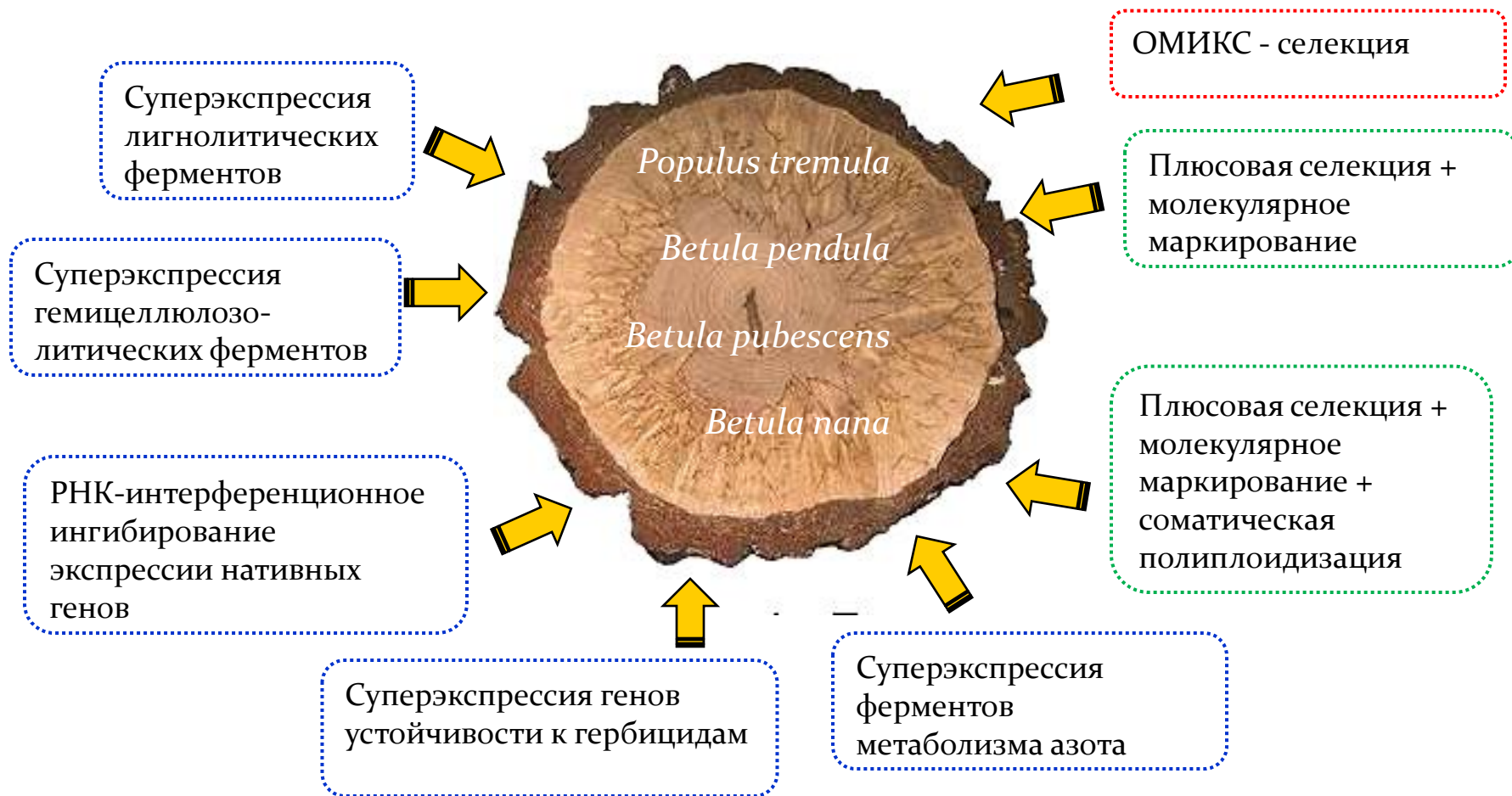
1000-1500 руб./м.куб.



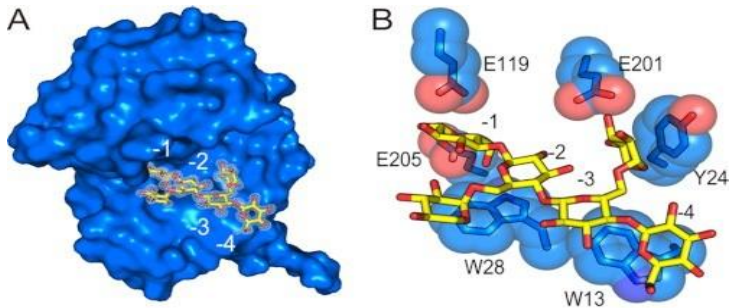
4000-5000
руб./м.куб.



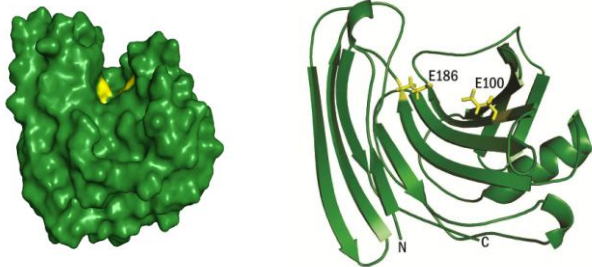
Используемые подходы при молекулярной селекции лесных древесных растений



Суперэкспрессия ксилоглюканазы из гриба *Penicillium canescens* в растениях *Populus tremula*



Пространственная структура ксилоглюканазы из *Aspergillus aculeatus*: А. – структура комплекса ксилоглюкан-ксилоглюканаза; Б. – взаимодействия между ксилоглюканом и ксилоглюканазой.

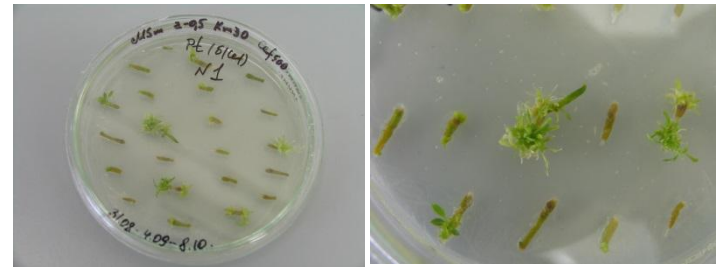


Пространственная структура ксилоглюканазы из *P. canescens*

90-100

Удельная активность

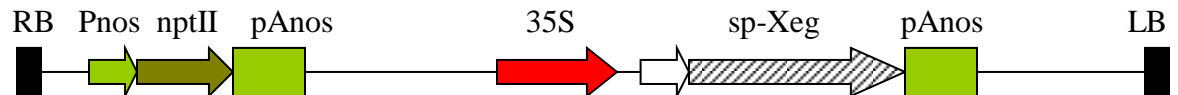
20-25



Агробактериальная трансформация

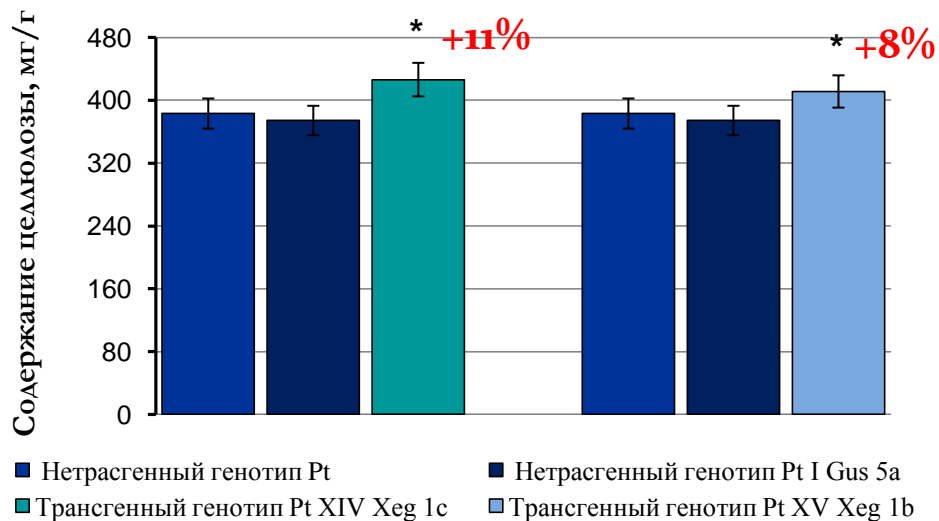
Итоги трансформации:

Вектор	Экспрессия кассета	Ген	Кол-во линий
pBI-Xeg	35S-XegA	Ксило-глюканаза	25



Структура Т-ДНК, несущей ген ксилоглюканазы

Трансгенные растения осины с рекомбинантным геном *sp-Xeg*, демонстрирующие повышенное содержание целлюлозы

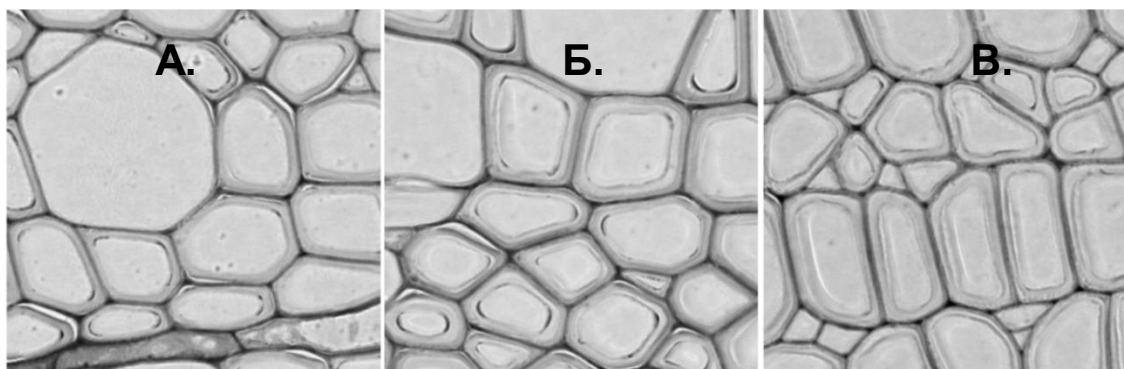


Содержание целлюлозы в стеблях после 12 месяцев вегетации в условиях *ex vitro*



Контроль

PtXVXeg1b



20µm

Микрофотография срезов клеток ксилемы растений возрастом 1,5 года: А. - контроль Pt, Б. - клон PtXIVXeg1c, В. - клон PtXVXeg1b

Толщина клеточной стенки:

контроль - 1,16 мкм.

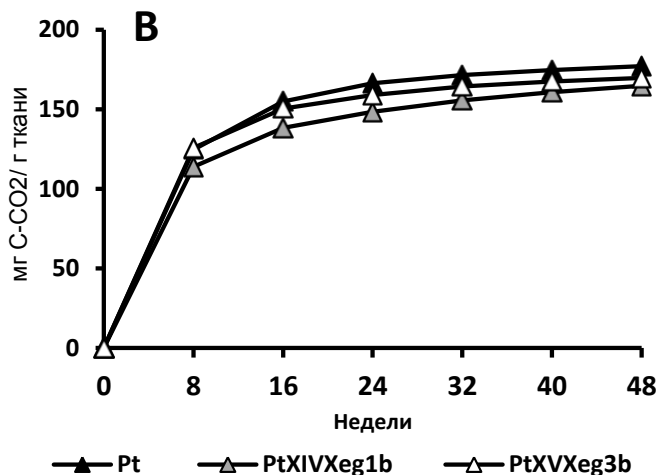
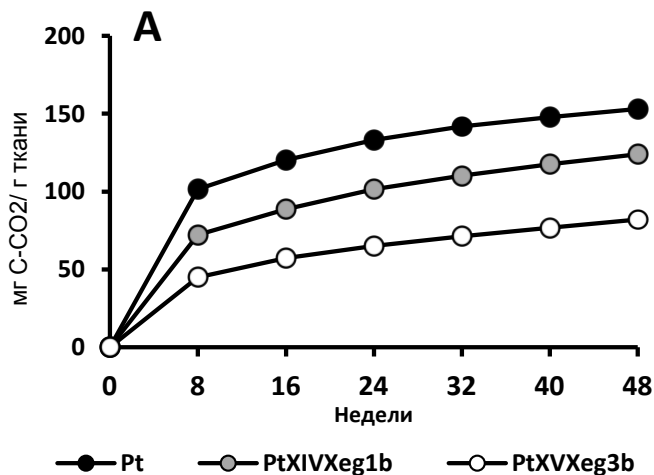
клон PtXIVXeg1c - 1,78 мкм.

Изменение углеводного состава ксилемы:

- ксилоза снижена на 20,8%

- глюкоза повышена на 28,9%

Замедление скорости разложения растительного материала осины *sp-Xeg*, изменение параметров древесного волокна



Кумулятивная эмиссия CO₂ при разложении стеблей (А) и корней (В) растений в течение года

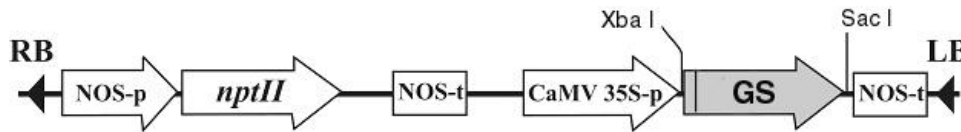
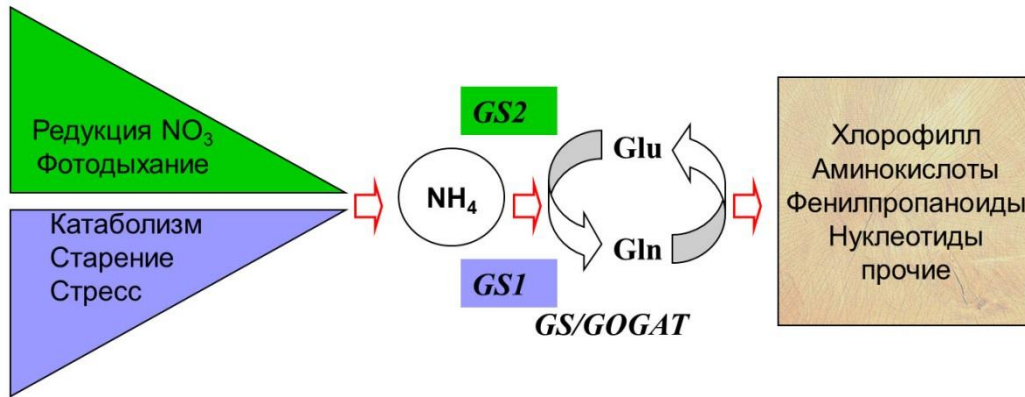


PtXVXeg1b Контроль

Изменение параметров древесного волокна

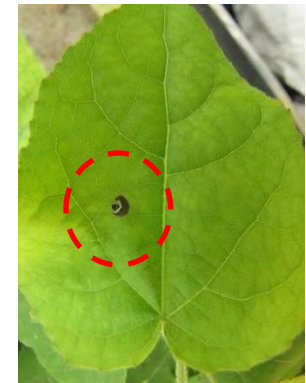
Название клона	Верх		Низ	
	Длина, мкм	Толщина, мкм	Длина, мкм	Толщина, мкм
Pt	350,26±21,4	16,28±0,73	551,33±20,5	19,9±0,83
PtXIVXeg1c	406,73±23,5*	16,37±0,81	532,78±24,5	19,92±0,98
PtXVXeg1b	416,27±22,9*	16,35±0,67	554,57±19,8	20±0,88

Суперэкспрессия глутаминсинтетазы GS1 сосны в растениях березы и осины



Вектор	Экспресс-я кассета	Ген	Организм-акцептор	Кол-во линий
pGS	35S-GS	Глутамин-синтетаза	<i>P. tremula</i> <i>B. pendula</i> <i>B. pubescens</i>	38

BAR-линия GS-линия



Примеры поражения верхних листьев растений разных линий сублетальной дозой фосфинотрицина – ингибитора глутаминсинтетазы



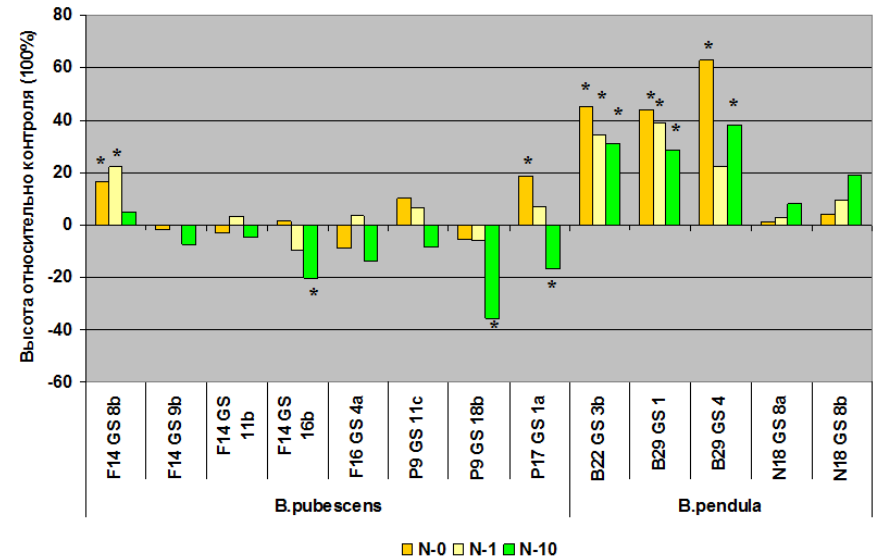
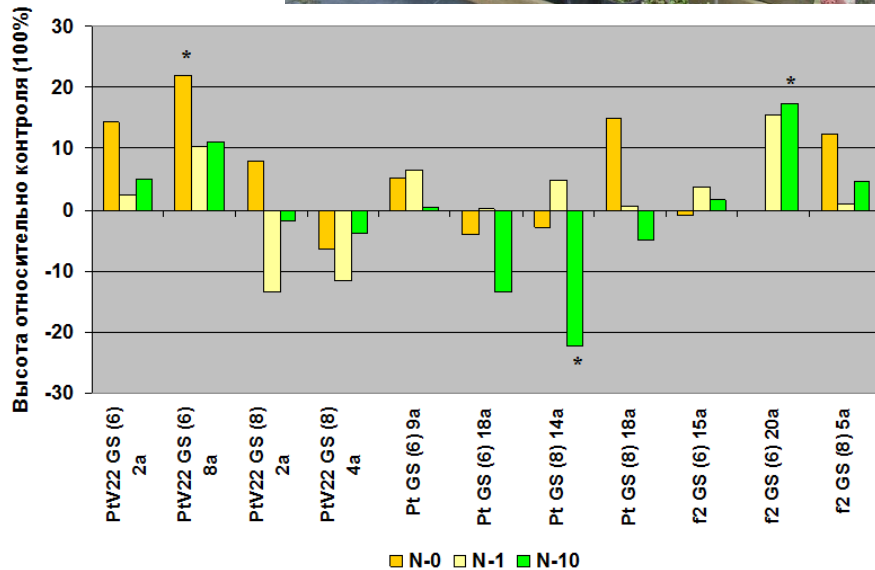
Контроль

Эффект доступности азота на рост трансгенных растений осины и березы с геном *GS*

Клоны осины

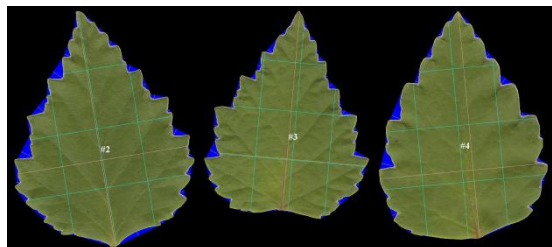


Клоны березы

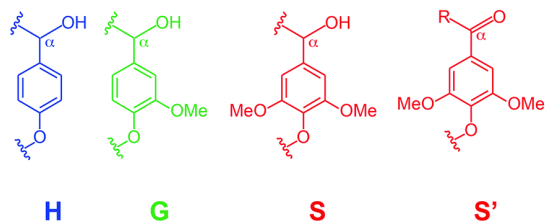


Сохранение продуктивности трансгенных растений осины и березы с геном глутаминсинтетазы GS1 сосны при дефиците азота

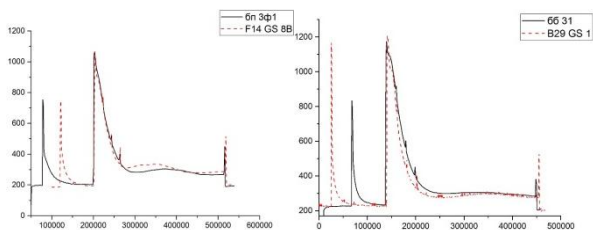
Биометрия



Состав лигнина



Фотосинтез



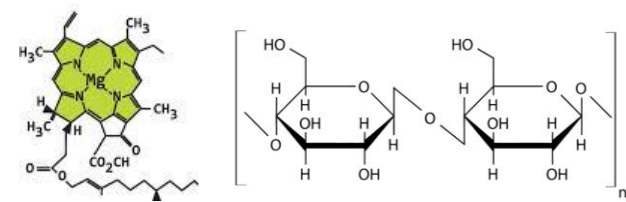
береза



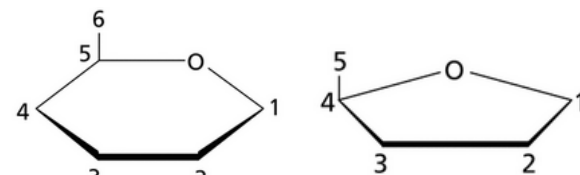
осина

Содержание азота
общий азот, NH_4^+ , NO_3^-

Пигменты листьев

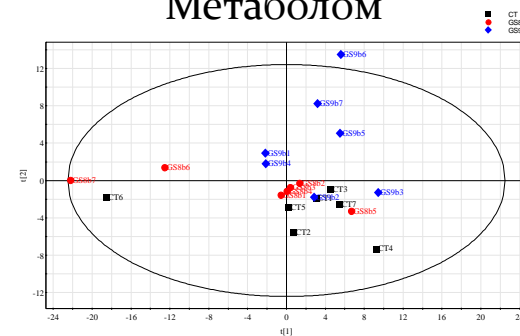


Состав полисахаридов



Glc, Gal, Man, Rha, Fuc, Xyl, Ara

Метаболом

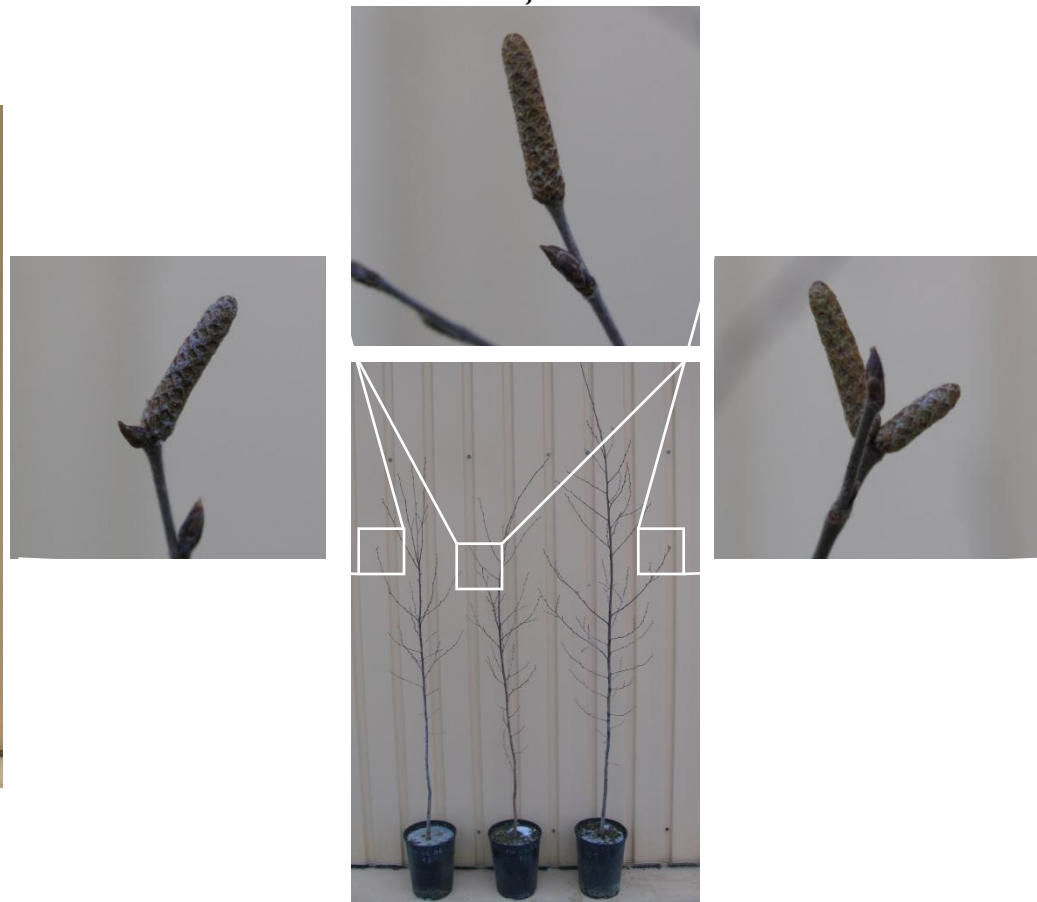


Непредвиденные эффекты гена GS глутаминсинтетазы сосны

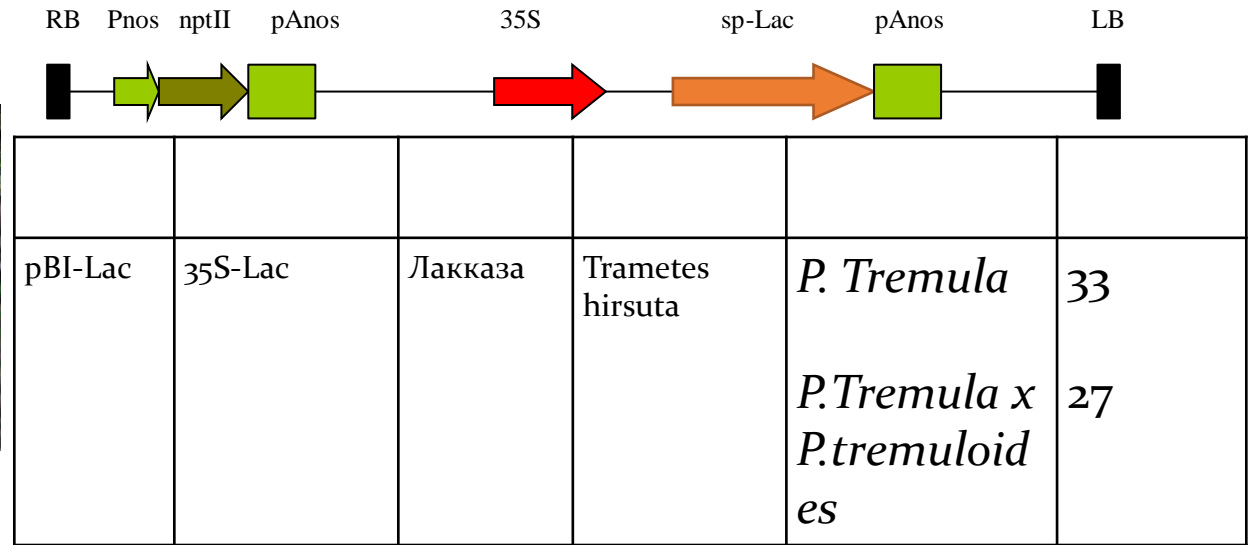
Изменение габитуса



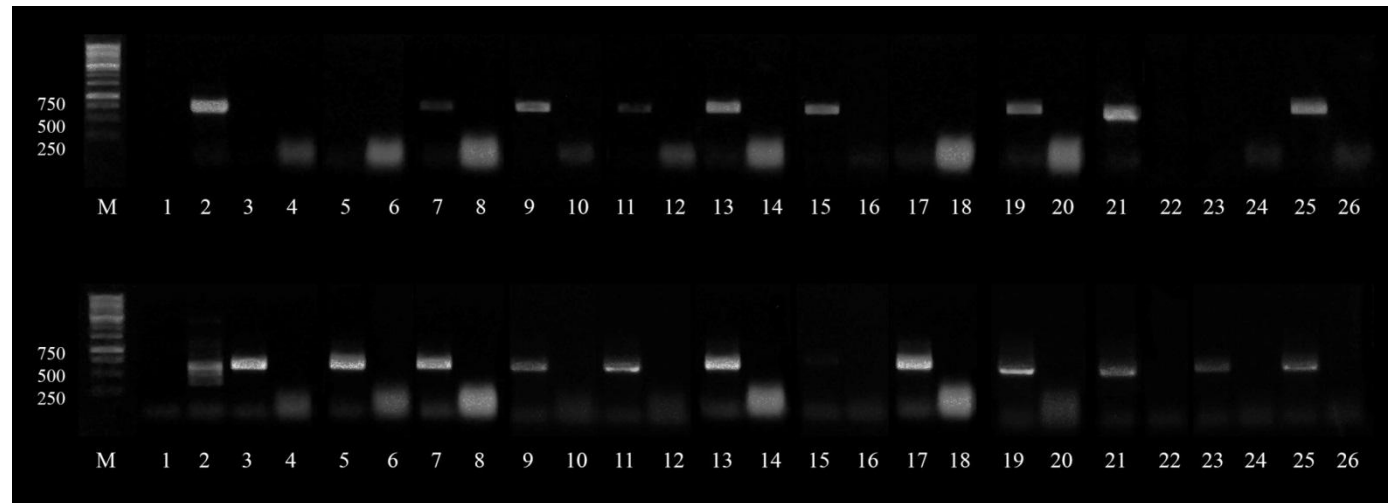
Раннее цветение



Суперэкспрессия лигнолитических ферментов (на примере гена лакказы из гриба *Trametes hirsuta*) в растениях *Populus tremula*



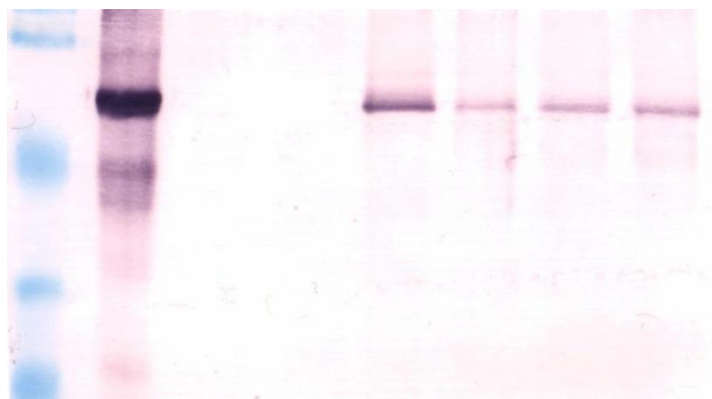
Линии с экспрессией гена *lac*:
lac3, *lac4*, *lac7*,
lac8, *lac15*,
lac22, *lac23*,
lac27.



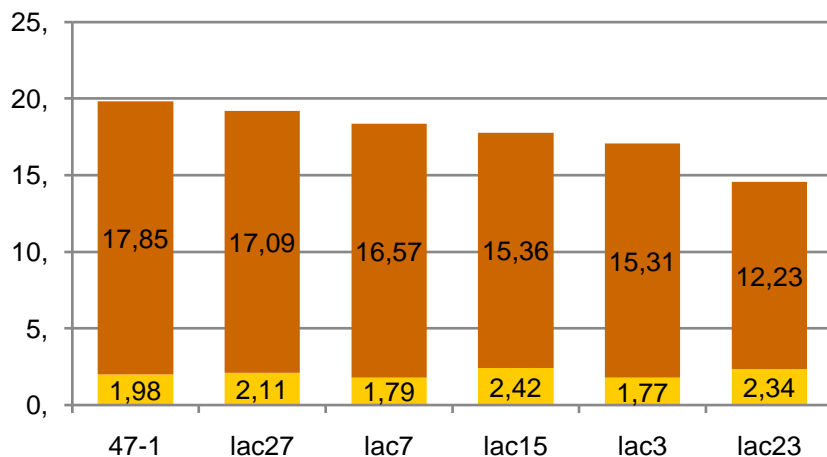
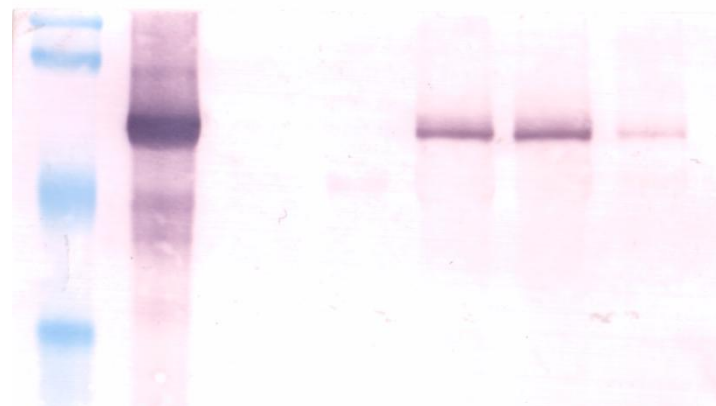
Анализ экспрессии рекомбинантного гена *Lac* лакказы из гриба *Trametes hirsuta*

К+ 47 Lac19 Lac14 Lac5 Lac7 Lac8

55кДа



К+ 47 Lac19 Lac23 Lac22 Lac15



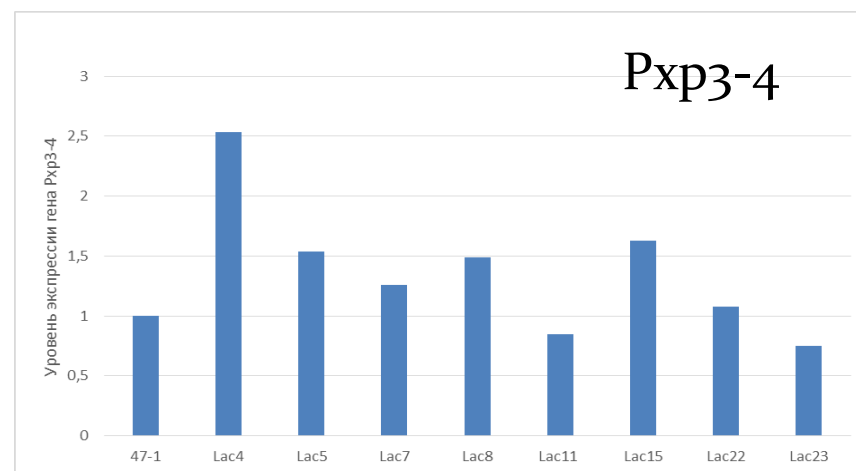
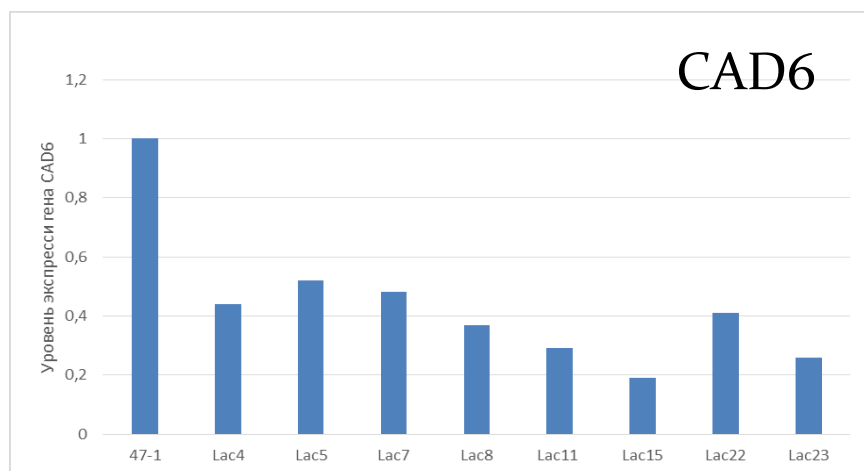
■ КНЛ
■ КРЛ



Анализ экспрессии генов биосинтеза лигнинов

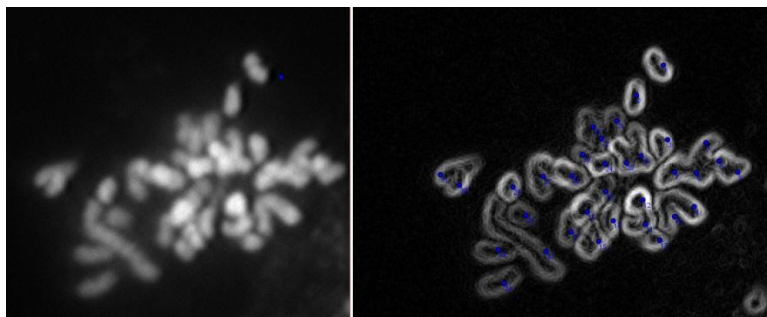
Клон	CAD6	CCoAOMT1	CCR1	Pxp3-4	4CL	MYB152
47-1	1	1	1	1	1	1
Lac4	0.44	0.89	1.26	2.53	1.35	1.65
Lac5	0.52	0.75	0.66	1.54	0.74	1.39
Lac7	0.48	0.75	0.8	1.26	0.68	2.26
Lac8	0.37	0.85	0.51	1.49	0.8	1.15
Lac11	0.29	0.48	0.4	0.85	0.64	0.96
Lac15	0.19	0.53	0.63	1.63	0.46	1.24
Lac22	0.41	0.65	0.54	1.08	0.78	1.06
Lac23	0.26	0.3	0.38	0.75	0.47	0.94

4CL, 4-coumarate:coenzyme A ligase;
 CCoAOMT, caffeoyl CoA O-methyltransferase;
 CCR, cinnamoyl-CoA reductase;
 CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase.

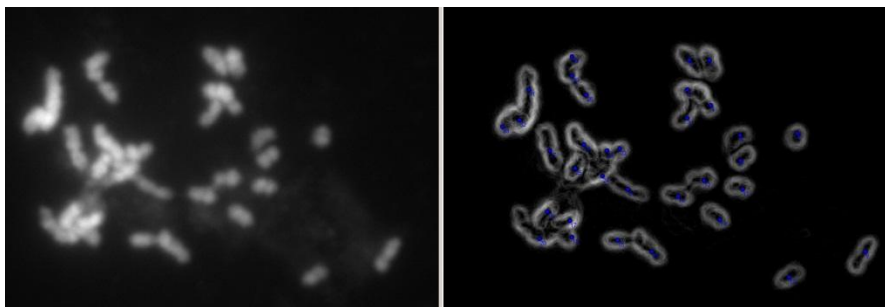


Определение ploидности: флуоресцентная микроскопия

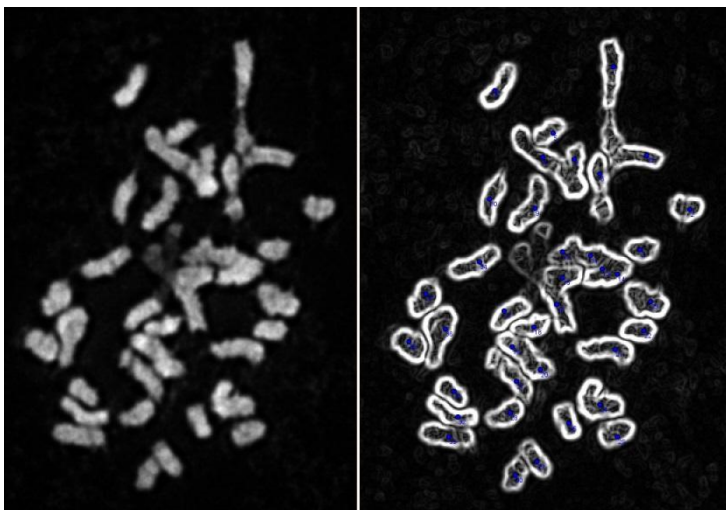
Лас-5



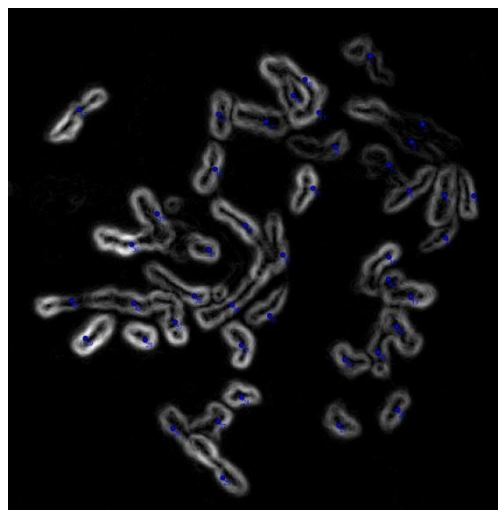
Лас-8



Лас-23



Контроль



n38



Работа проводилась совместно с ИМБ РАН, лаборатория молекулярной кариологии,
д.б.н. О.В.Муравенко



2 года

открытая
площадка



зимовка в естественных условиях

Линии:

47 - контроль

lac5

lac7

lac8

lac23

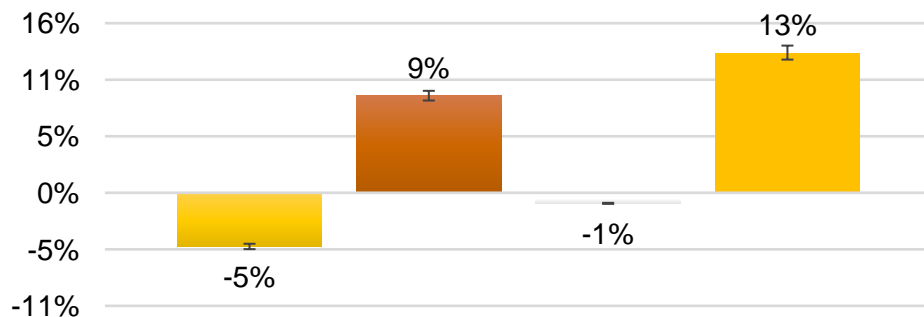
50 растений на каждую линию



Анализ биометрических показателей трансгенных растений осины с геном *Lac*

линия	высота, см	кол-во м-узел	кол-во ветвей	D, мм	l ветви, см	V ствола, см ²
контр	114,8	34,3	17	8,78	2,07	36,93
47 Lac 5	108,8	29,1	18,5	8,72	1,91	33,97
47 Lac 7	125,7	36,8	19,3	9,29	1,74	42,77
47 Lac 8	114,2	30,9	21,8	9,44	1,95	39,89
47 lac 23	129,8	39	12,1	8,54	3,40	39,21

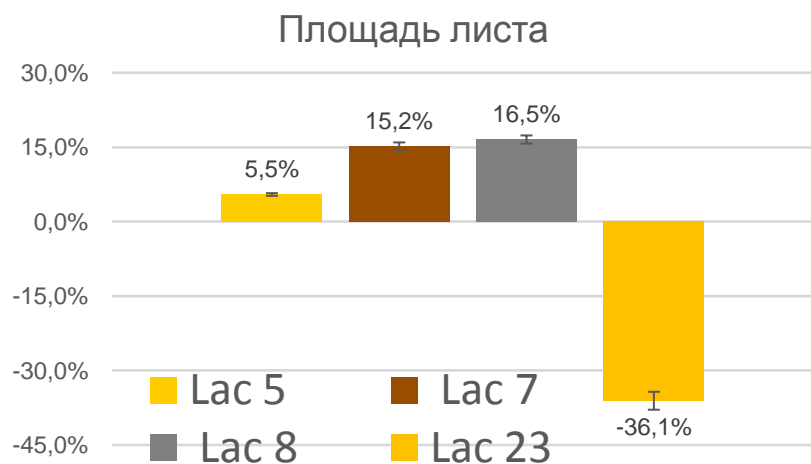
Высота растений



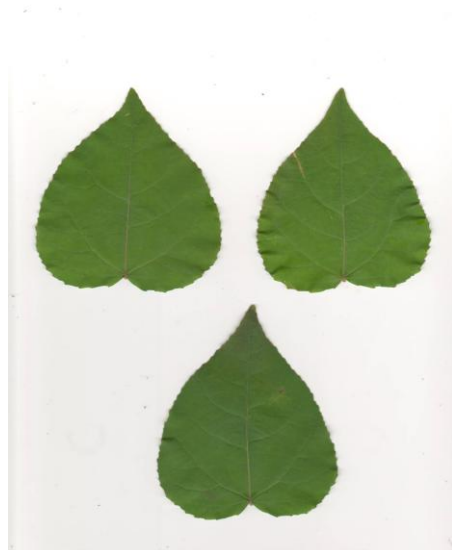
1

■ Lac 5 ■ Lac 7 ■ Lac 8 ■ lac 23

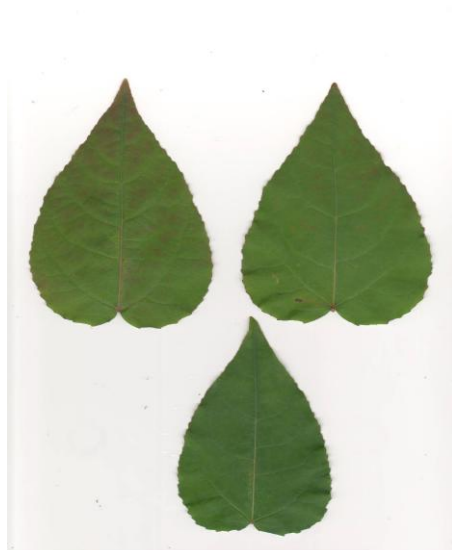
Морфометрия листьев линий осины с геном *lac*



Линия	Округлость, %	дл/шир	Горизонт. симметрия
контроль	85,94	1,37	0,38
Lac 5	88,34	1,29	0,41
Lac 7	86,87	1,34	0,39
Lac 8	89,13	1,24	0,40
Lac 23	85,07	1,41	0,39



Контроль

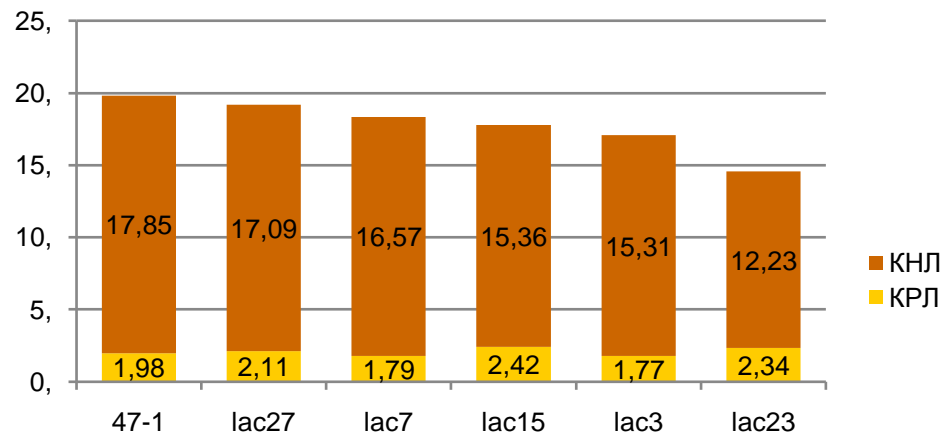
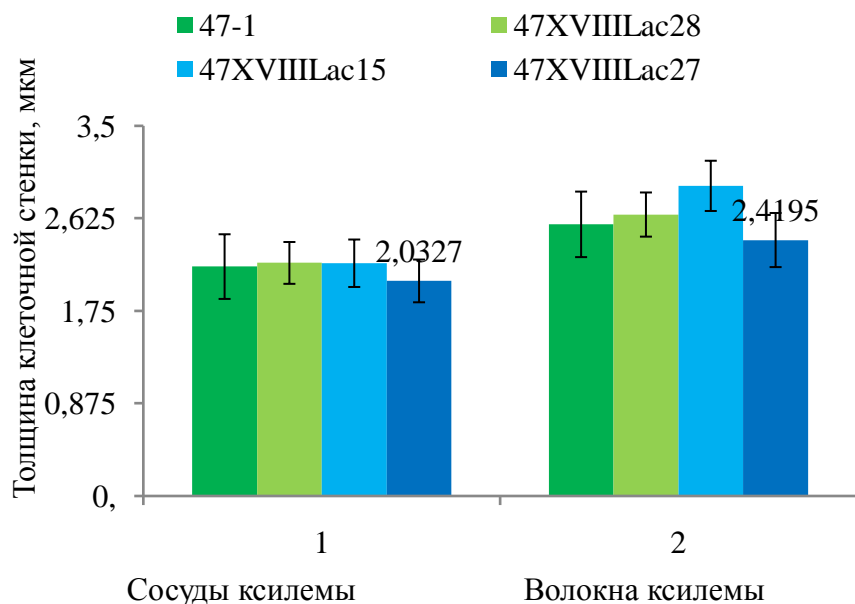


lac8

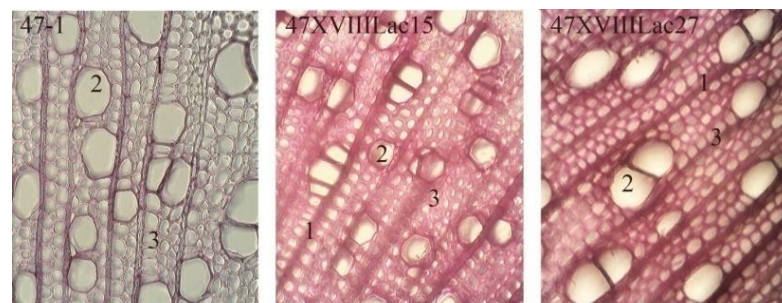


lac23

Суперэкспрессия лигнолитических ферментов (на примере гена лакказы из гриба *Trametes hirsuta*) в растениях *Populus tremula*



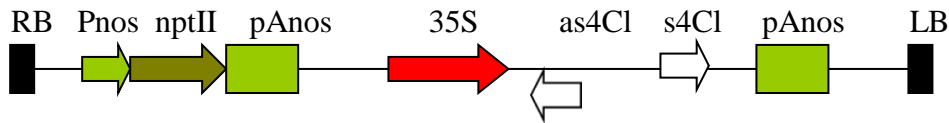
Толщина клеточной стенки сосудов и волокон ксилемы (мкм) в трансгенных клонах осины с экспрессией гена *lac*



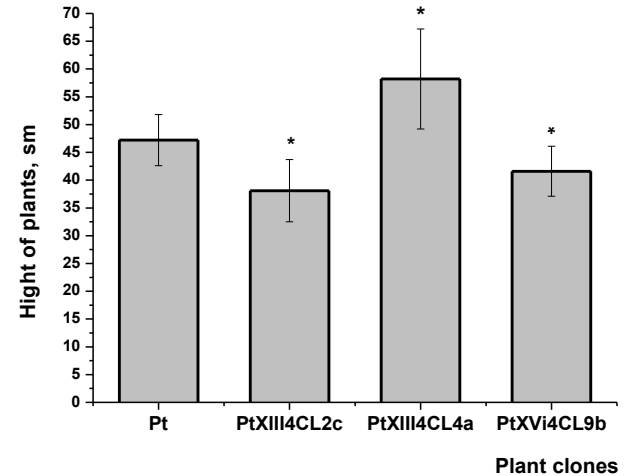
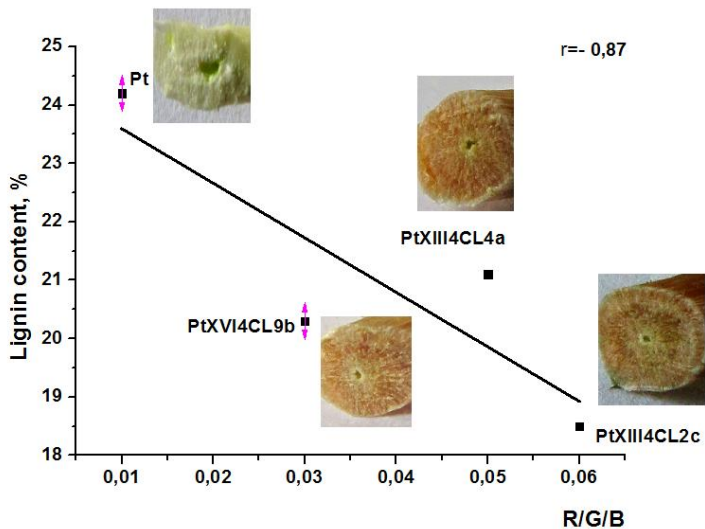
Поперечные срезы стебля клонов осины с экспрессией целевого гена *lac*: 1 – лучи паренхимы; 2 – сосуды ксилемы; 3 – волокна ксилемы.

РНК-интерференционное ингибирование экспрессии нативных генов (на примере гена биосинтеза лигнинов - 4CL)

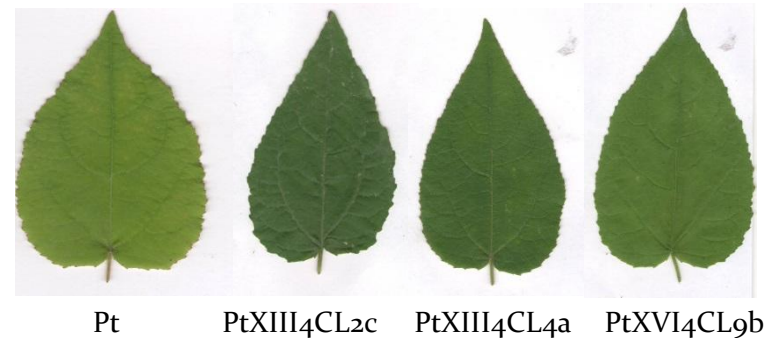
РНК-интерференционная конструкция с инвертированными повторами гена гена 4-кумарат-КоА-лигазы тополя



Снижение содержания лигнинов сопровождалось побурением древесины



Изменение формы и цвета листовой пластинки



Заражение мучнистой росой (*Uncinula adunca*) растений осины 4CL

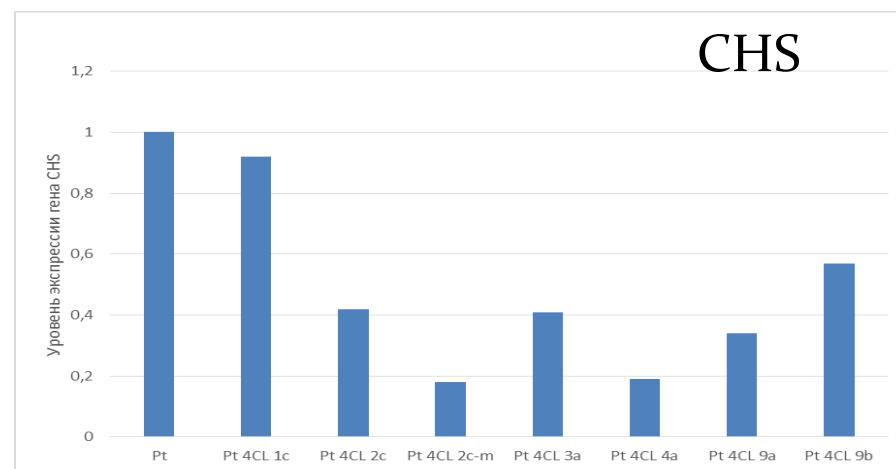
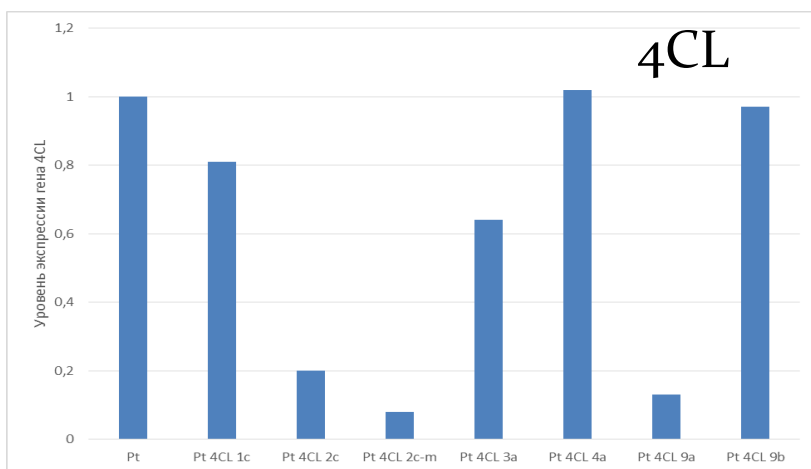
- Осмотр каждого растения и оценка пораженности листовой пластинки по баллам от 1 до 5*
- Pt (контроль) имеет наименьшее количество пораженных растений и минимальный бал пораженности листовой пластины



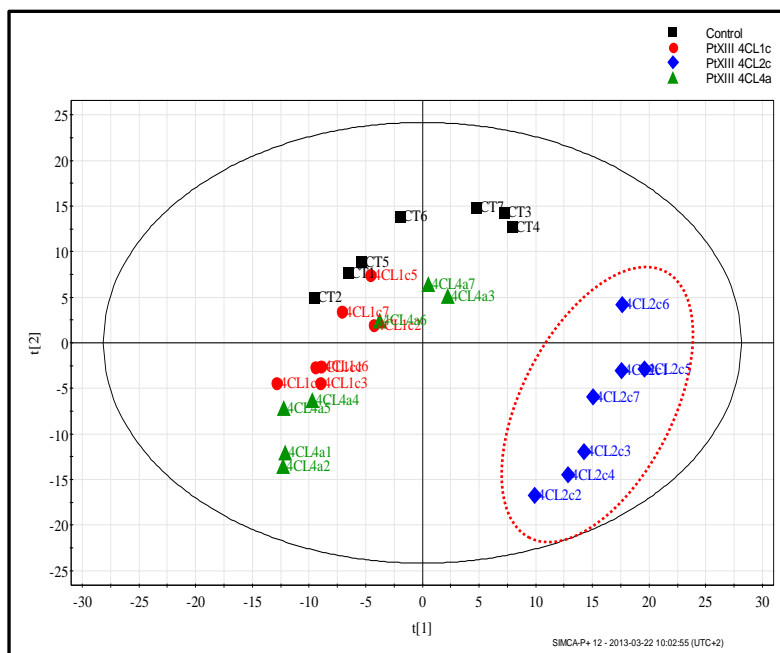
Генотип	Растения, всего/зараженных	Поражение л.п, у. б.
Pt4CL2c	33/7	2,34
Pt4CL3a	33/6	2,32
Pt4CL4a	29/4	2,11
Pt4CL9b	33/4	1,35
Pt4CL1c	29/2	1,3
Pt	46/2	1,25

Анализ экспрессии генов биосинтеза лигнинов трансгенных линий осины Pt4CL

Клон	4CL	CAD6	CCR1	CCoAOMT1	CHS
Pt	1	1	1	1	1
Pt4CL1c	0.81	0.4	0.61	1.33	0.92
Pt 4CL 2c	0.2	0.59	0.77	0.98	0.42
Pt 4CL 2c-m	0.08	1.22	0.43	0.57	0.18
Pt 4CL 3a	0.64	0.54	1.23	0.94	0.41
Pt 4CL 4a	1.02	1.81	1.05	1.42	0.19
Pt 4CL 9a	0.13	1.11	0.85	0.82	0.34
Pt 4CL 9b	0.97	1.28	0.94	1.18	0.57



Анализ различий в транскриптоме и метаболоме образцов трансгенной линии осины PtXIII₄CL2с с инвертированными повторами гена 4CL



Анализ ГХ-МС различий в метаболоме: метод главной компоненты (PCA)

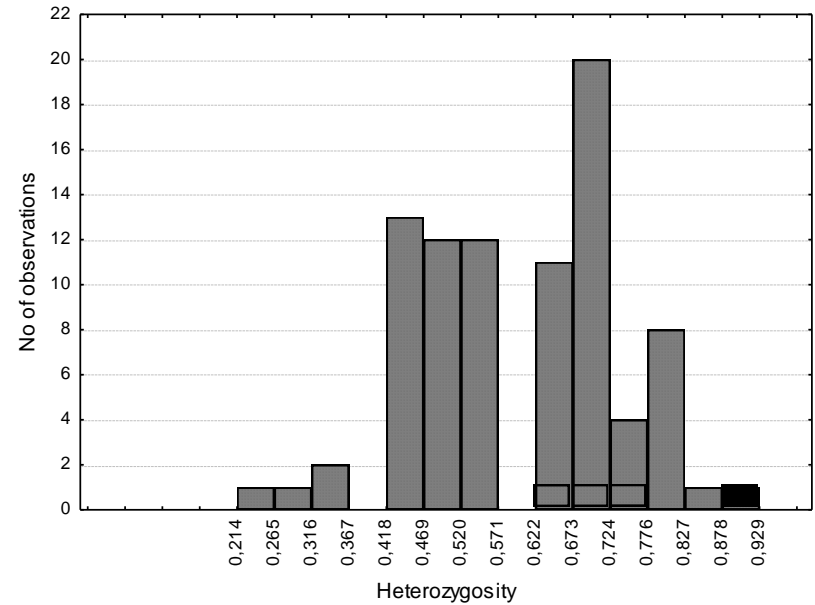
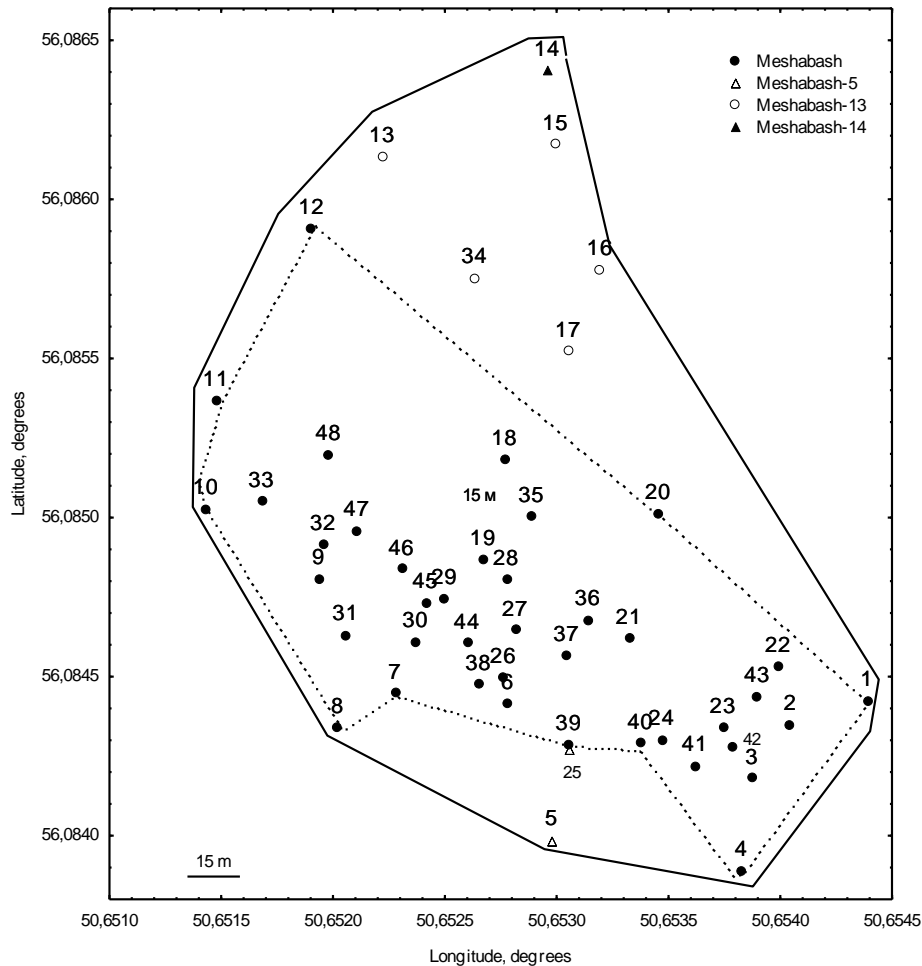
Из 52 метаболитов, представленных в таблице у клона PtXIII₄CL2с

34 метаболита показали значимые отличия от контроля.

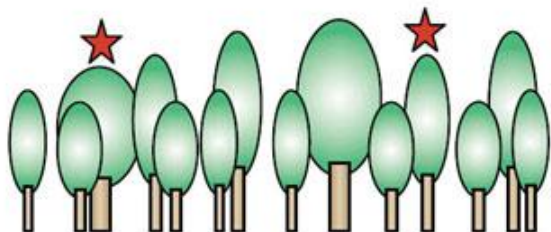
Содержание 13 достоверно уменьшилось, а 21 увеличилось

Изменения в транскриптоме оказались комплексными, наиболее значимые различия касались фотосинтеза, биосинтеза лигнинов, преобразования энергии и передачи сигналов.

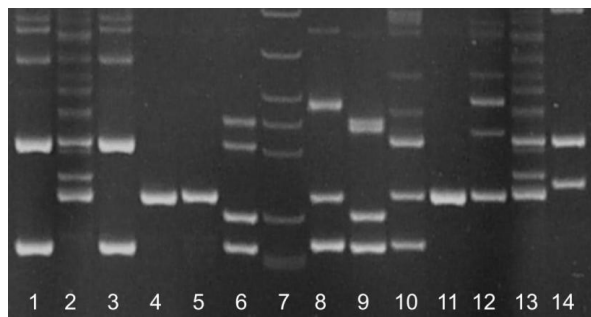
Маркерная селекция уникального генотипа *Populus tremula* (одна особь занимает 2 га)



Комбинированные методы лесной селекции

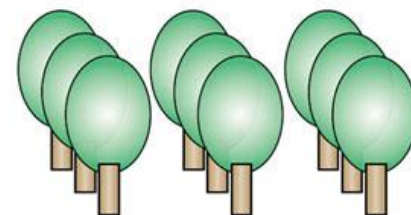


Плюсовая селекция по фенотипу



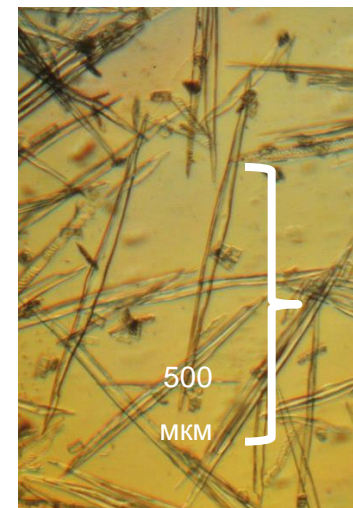
Идентификация уникальных генотипов молекулярными маркерами

Клональное микроразмножение уникального генотипа



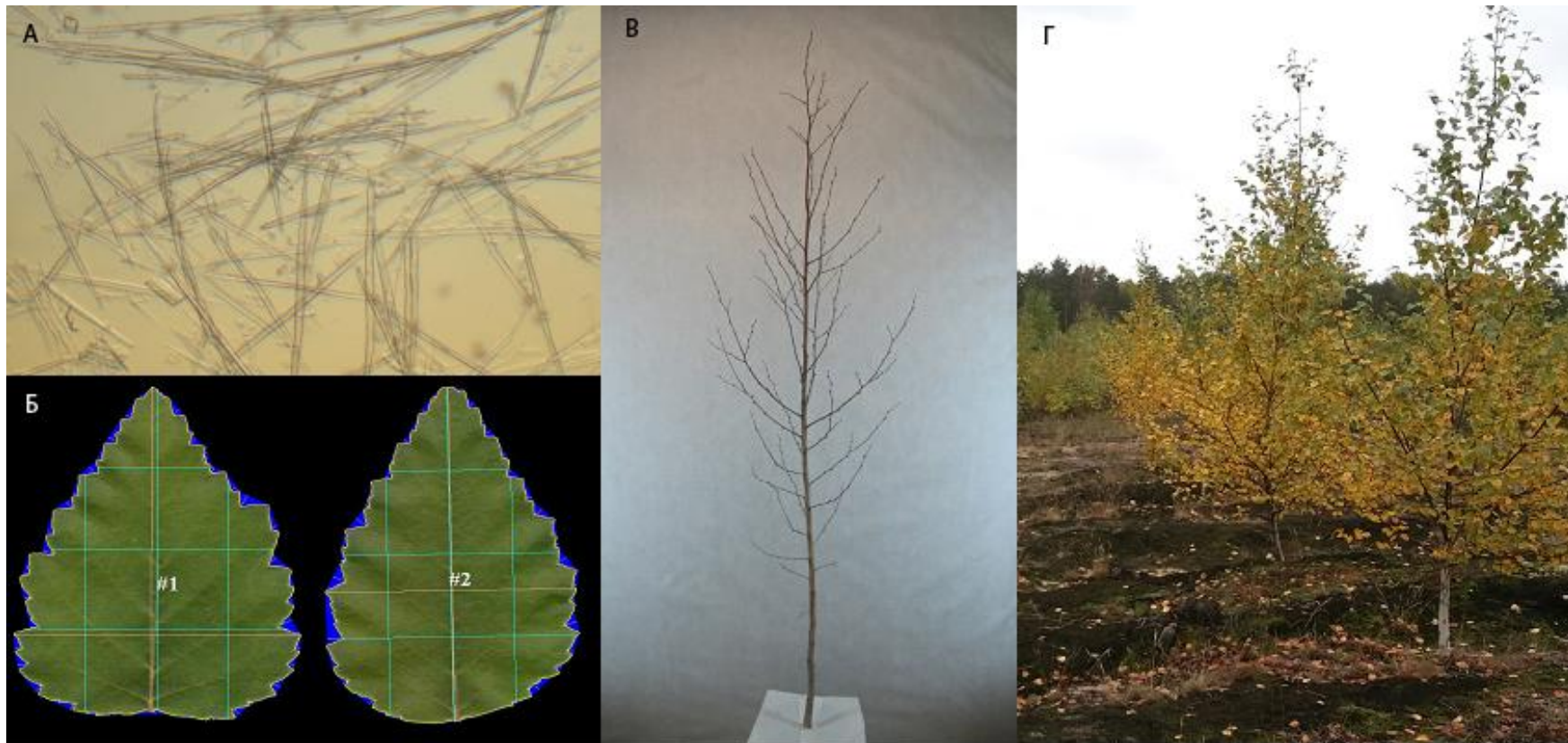
Соматическая полиплоидизация

Клон	Длина, мкм	Ширина, мкм
PtV22	390,10 ± 27,8	16,15 ± 1,14
Мутант 4	543,10 ± 38,4	21,43 ± 1,58



На четыре уникальных генотипа заключены соглашения с промышленными партнерами о продаже

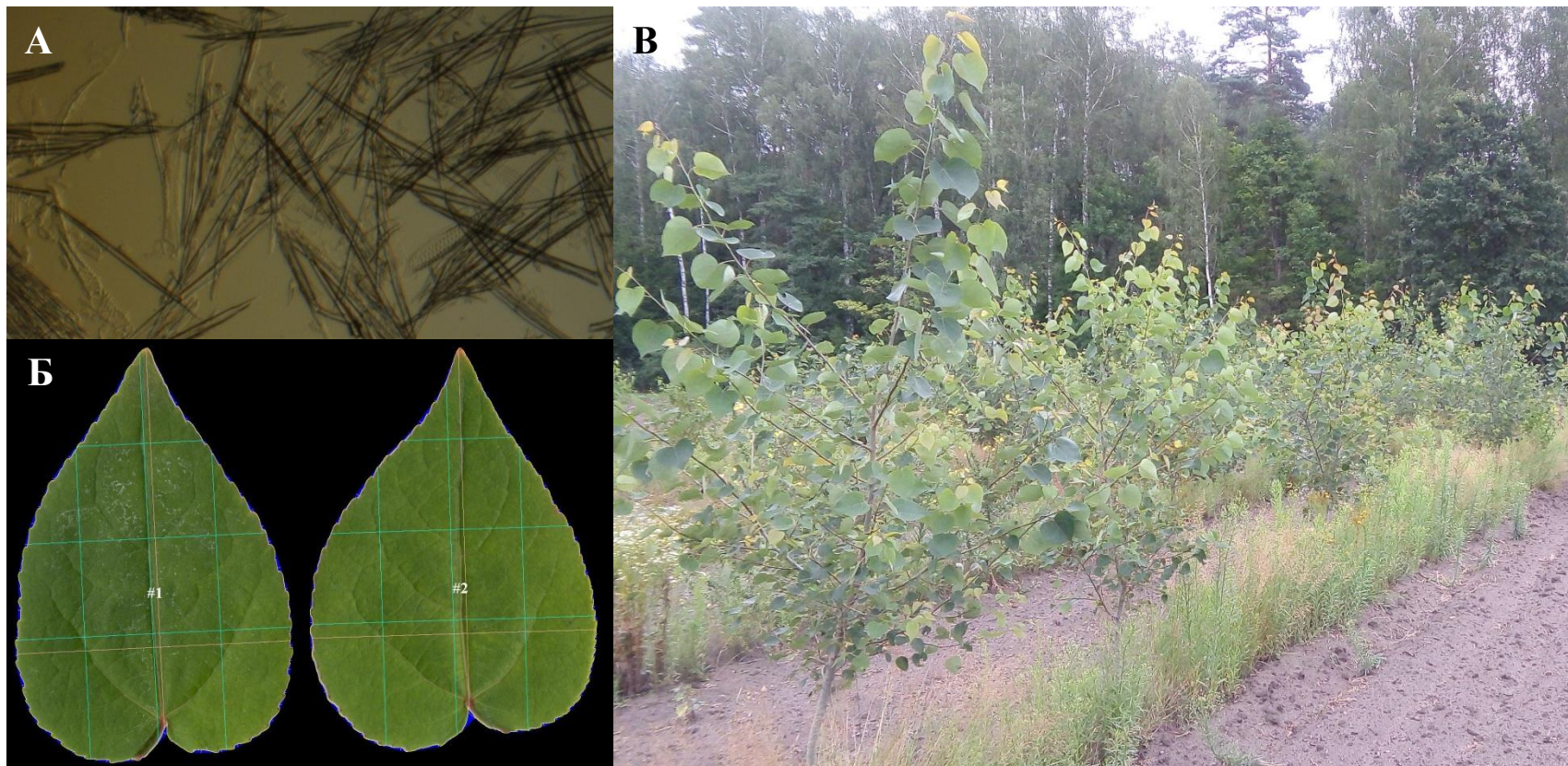
Создание селекционных достижений (не ГМО): Сорта березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) **Белрос-3** и **Белрос-4**



А – древесное волокно; Б – оценка листовых параметров; В – габитус генотипа; Г – растения березы в полевых условиях

Береза является основной лесообразующей лиственной породой Российской Федерации, занимая 15% площади лесопокрываемых земель. До настоящего времени в Государственном реестре селекционных достижений не зарегистрировано ни одного сорта березы. Впервые в России создан сорт березы пушистой, который отличается от неселекционных генотипов высокой стабильностью различных ростовых характеристик, повышенной продуктивностью и увеличенными размерами древесного волокна. Генотип может быть использован в плантационных насаждениях интенсивного типа.

Создание селекционных достижений (не ГМО): Сорты осины (*Populus tremula*) **Окская** и **Заокская**

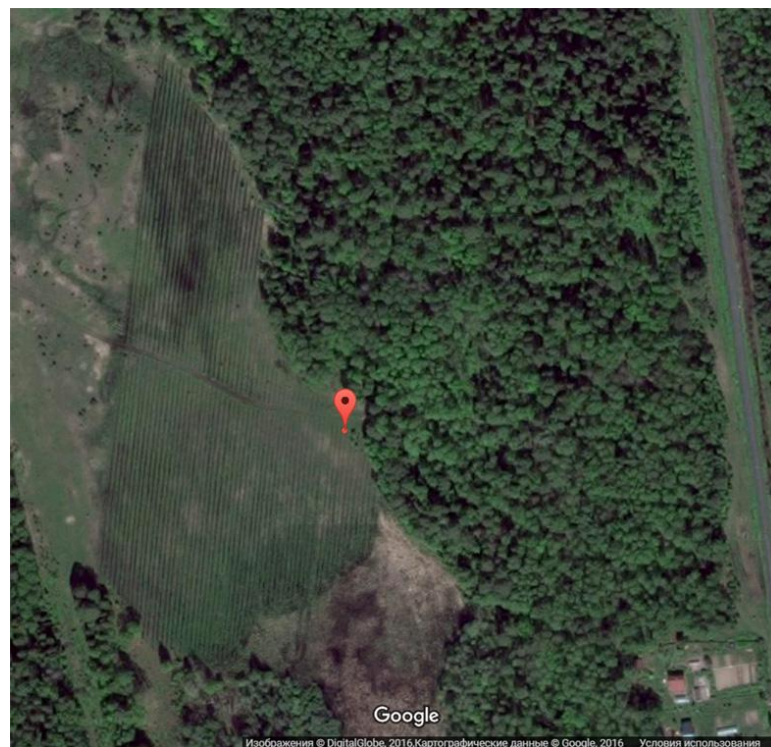


А – древесное волокно; Б – оценка листовых параметров; В – растения осины в полевых условиях

Осина является второй после березы лесообразующей лиственной породой Российской Федерации, занимая 3% площади лесопокрываемых земель. К настоящего времени в Государственном реестре селекционных достижений зарегистрировано семь сортов тополей, но нет ни одного сорта осины. Впервые в России создан сорта осины, которые отличается от неселекционных генотипов высокой продуктивностью, увеличенными размерами древесного волокна и устойчивостью к заболеваниям. Генотип может быть использован в плантационных насаждениях интенсивного типа.

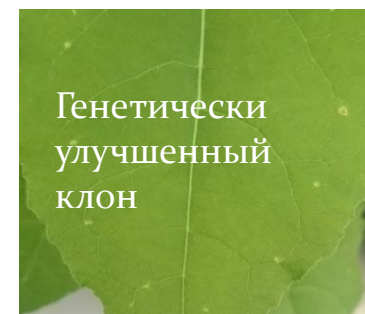
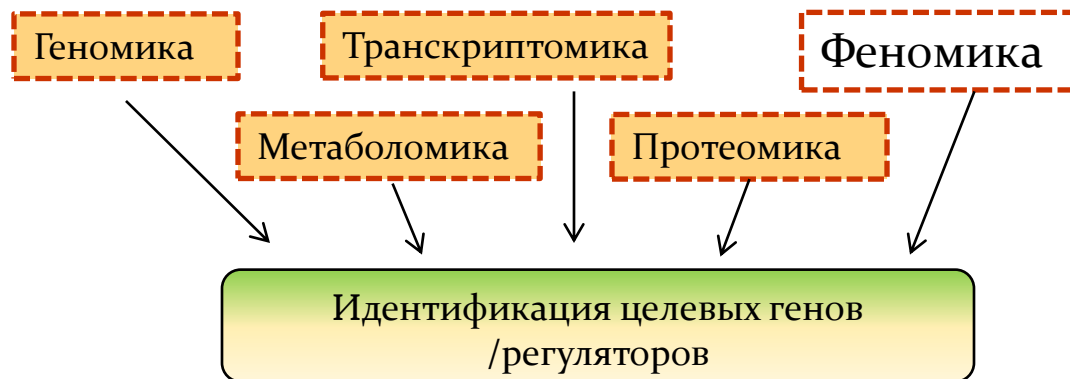
Использование селекционных достижений индустриальными партнерами при создании опытных лесных плантаций

Регион	Организация	Площадь, га
Вологодская обл.	ООО «Толшменское»	95
Кировская обл.	ООО «Алмис»	10
Республика Татарстан	ООО «Сабинский лесхоз»	100
Воронежская обл.	Воронежская государственная лесотехническая академия	51
Республика Марий Эл	ООО «Мартрэйд»	60
ВСЕГО		316

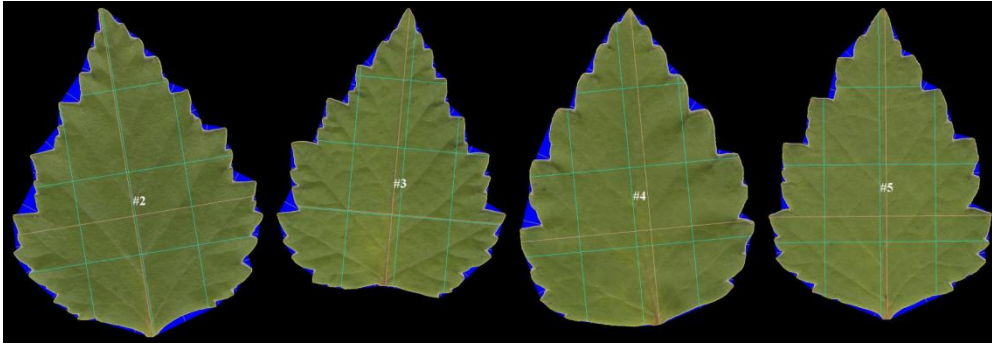


*Плантация в Республике Марий Эл, квартала 75,87,88, земли УОЛ ПГТУ
Год закладки 2015*

ФЕНОМИКА – ключевой элемент молекулярной селекции



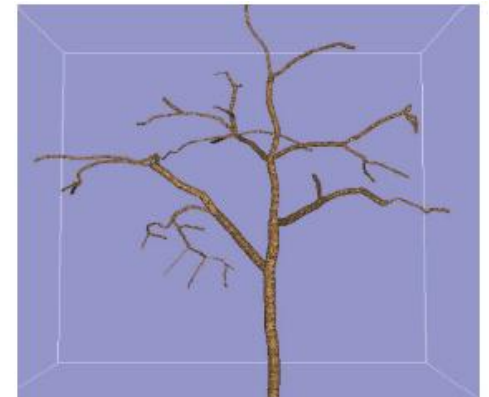
Методология анализа модификаций и особенностей фенотипа



Анализ параметров листовой пластинки трансгенных растений осины и березы с помощью программы LAMINA



Фенотипирование трансгенных растений березы для построения 3D модели





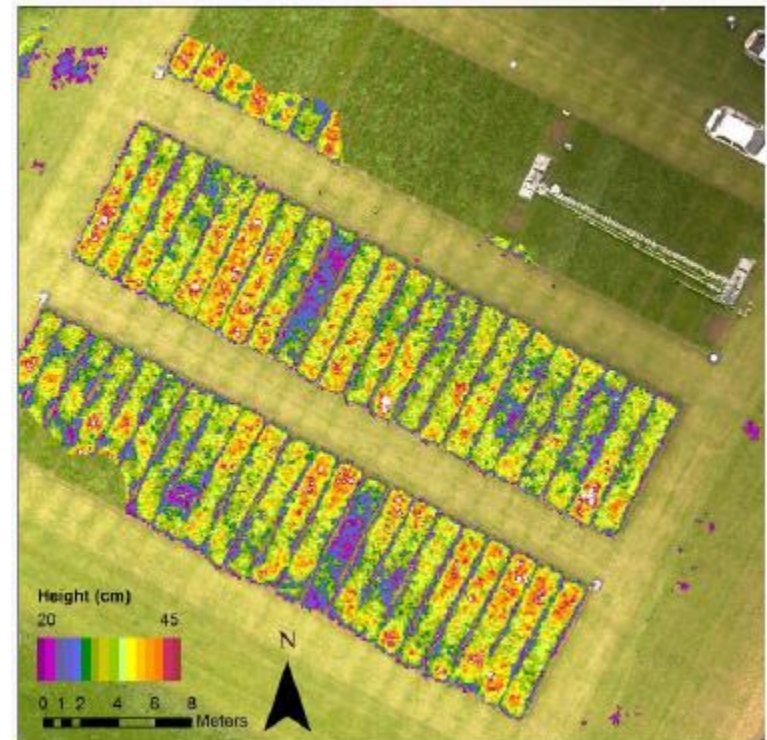
Центры по феномике за рубежом:

2006- Jülich Plant Phenotyping Centre
(Germany)

2009 - High Resolution Plant Phenomics Centre
(Canberra, Australia)

2012 - National Plant Phenomics Centre
(Aberystwyth University, UK)

2013 - Bellwether Foundation Phenotyping
Facility at Donald Danforth Plant Science Center
(USA)



Спасибо за внимание!

