

Российская академия наук

Филиал института биорганической химии им.
академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова

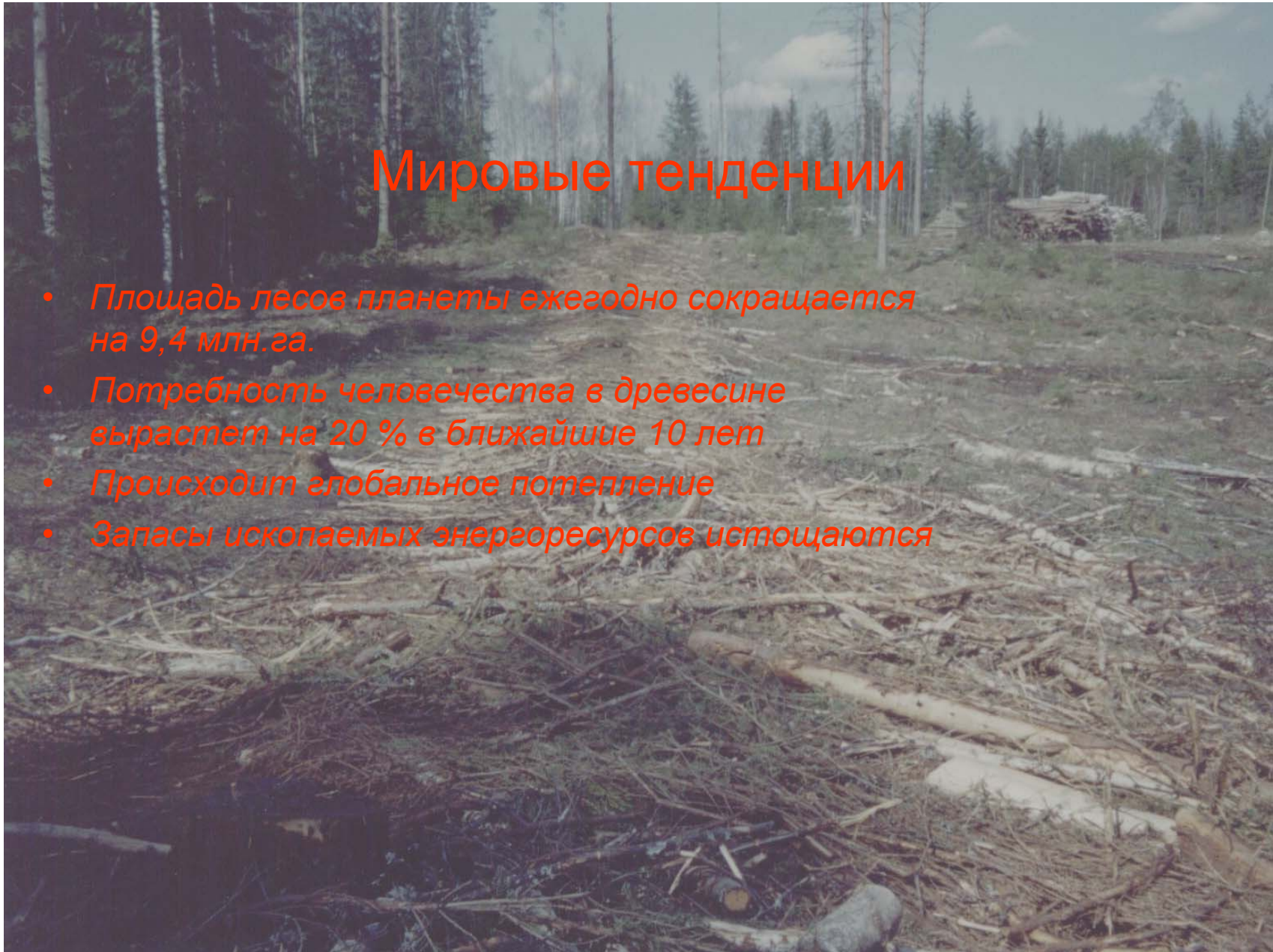
Лесная биотехнология:
современное состояние и перспективы
развития

Шестибратов К.А.

Академик Мирошников Анатолий Иванович

Мировые тенденции

- *Площадь лесов планеты ежегодно сокращается на 9,4 млн.га.*
- *Потребность человечества в древесине вырастет на 20 % в ближайшие 10 лет*
- *Происходит глобальное потепление*
- *Запасы ископаемых энергоресурсов истощаются*



Лесные плантации или ...?

Всего 5 % всех лесов планеты являются плантациями

Около 25 % всего ежегодно производимой древесины собирается с плантаций

Достигнутая продуктивность лесных пород на плантациях составляет:

эвкалипт – от 20 до 70 м³/га в год

тополь – от 20 до 40 м³/га в год

ива - от 10 до 25 м³/га в год

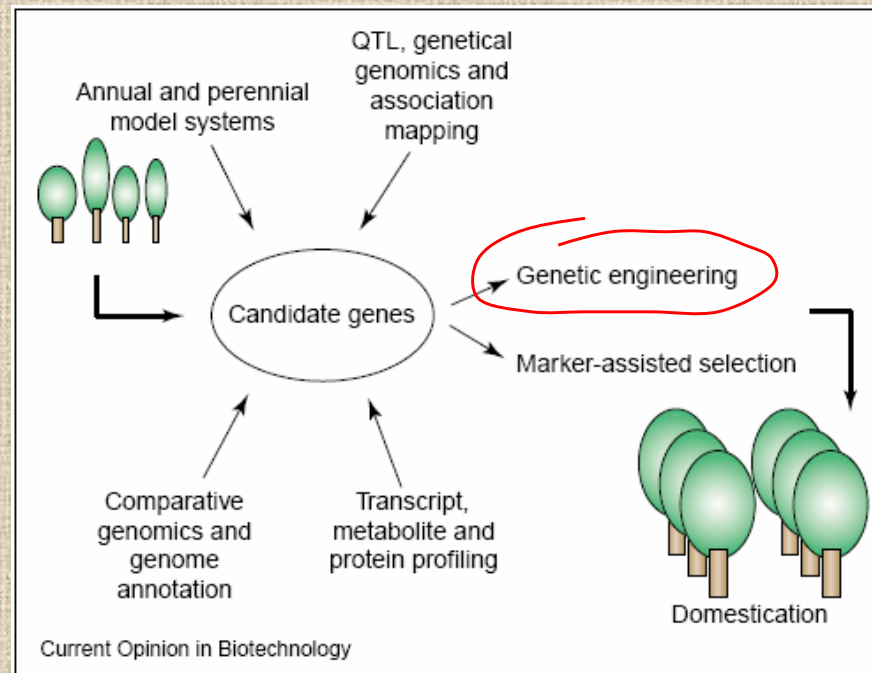
Плантации трансгенных тополей – Китай, 5 млн.растений

Лесная селекция: традиционная или ускоренная?

• В силу длительных жизненных циклов традиционная селекция – процесс крайне медленный

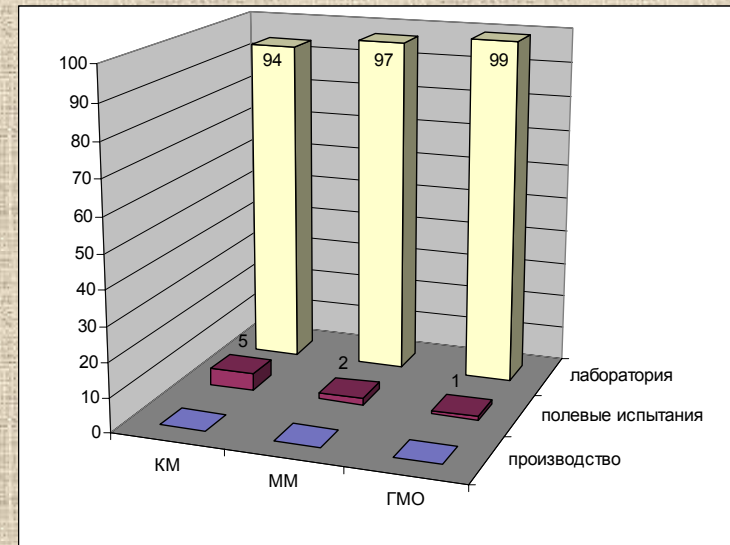
• Альтернативным способом является – ускоренная селекция, с использованием методов биотехнологии

• Основной проблемой является дефицит идентифицированных генов, кодирующих хозяйственно ценные признаки



Основные направления биологических технологий в лесном секторе

- ❑ *Технологии молекулярного маркирования*
 - *Селекция на основе молекулярных маркеров*
 - *Генетическая паспортизация*
- ❑ *Технологии культуры in vitro растений*
 - *Клональное микроразмножение*
 - *Криоконсервация и депонирование in vitro*
- ❑ *Технологии генетической трансформации*
 - *Ингибирование собственных генов*
 - *Экспрессия новых генов*



КМ – клональное микроразмножение

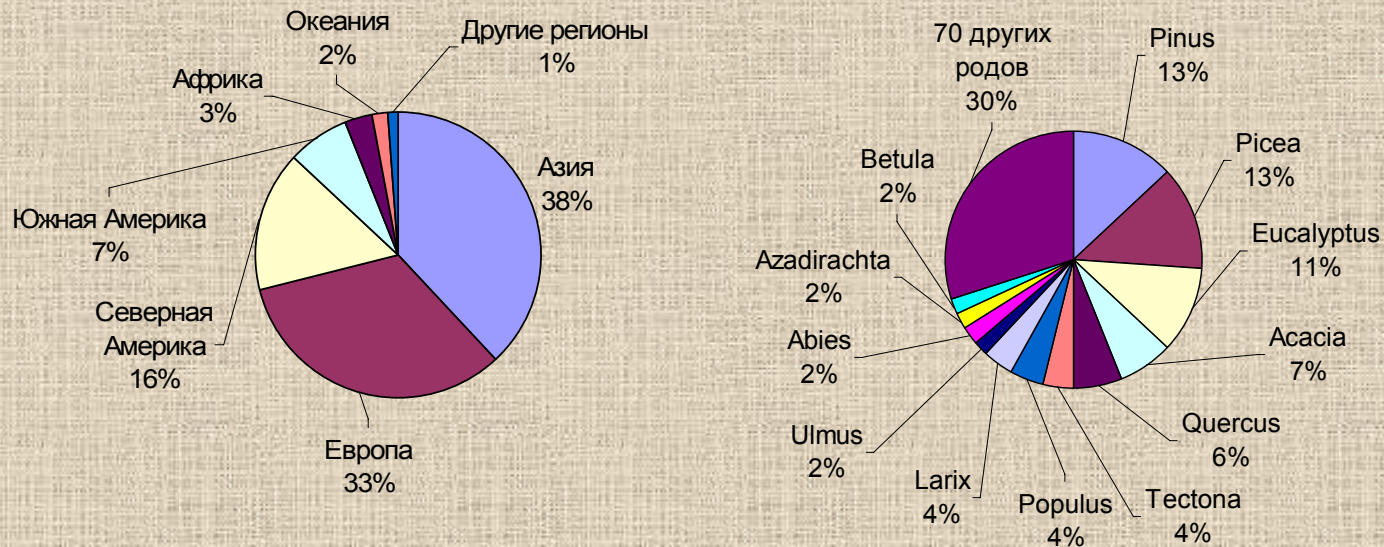
ММ – молекулярное маркирование

ГМО – генетически модифицированные организмы

Спектр решаемых задач:



Клональное микроразмножение



FAO, Preliminary review of biotechnology in forestry (2005):

142 рода лесных древесных растений.

Половина всех работ приходится на пять родов: *Pinus*, *Picea*, *Eucalyptus*, *Acacia*, *Quercus*.

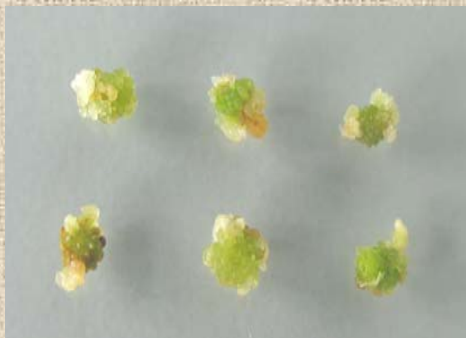
Соматический эмбриогенез - 65%, стеблевая культура - 13%.

Конкурентные преимущества технологий культуры in vitro растений

- Высокая производительность*
- Внесезонная работа*
- Возможность получения посадочного материала трудно размножаемых видов*
- Размножение гибридных форм с сохранением ценных свойств*
- Оздоровление посадочного материала*
- Возможность автоматизации процесса клонального микроразмножения*
- Генетическая однородность посадочного материала*

Соматический эмбриогенез

Инициация



Формирование ЭСМ



Пролиферация



Созревание



Соматические эмбрионы



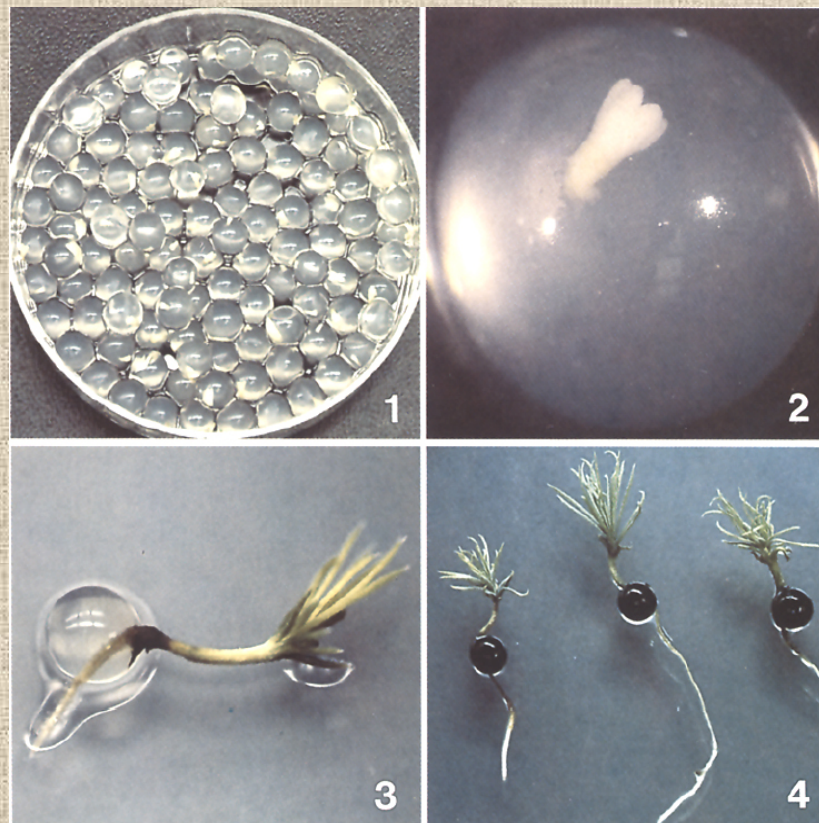
Искусственные семена на основе соматических эмбрионов

Основные этапы:

– получение растительного материала (соматических эмбрионов)

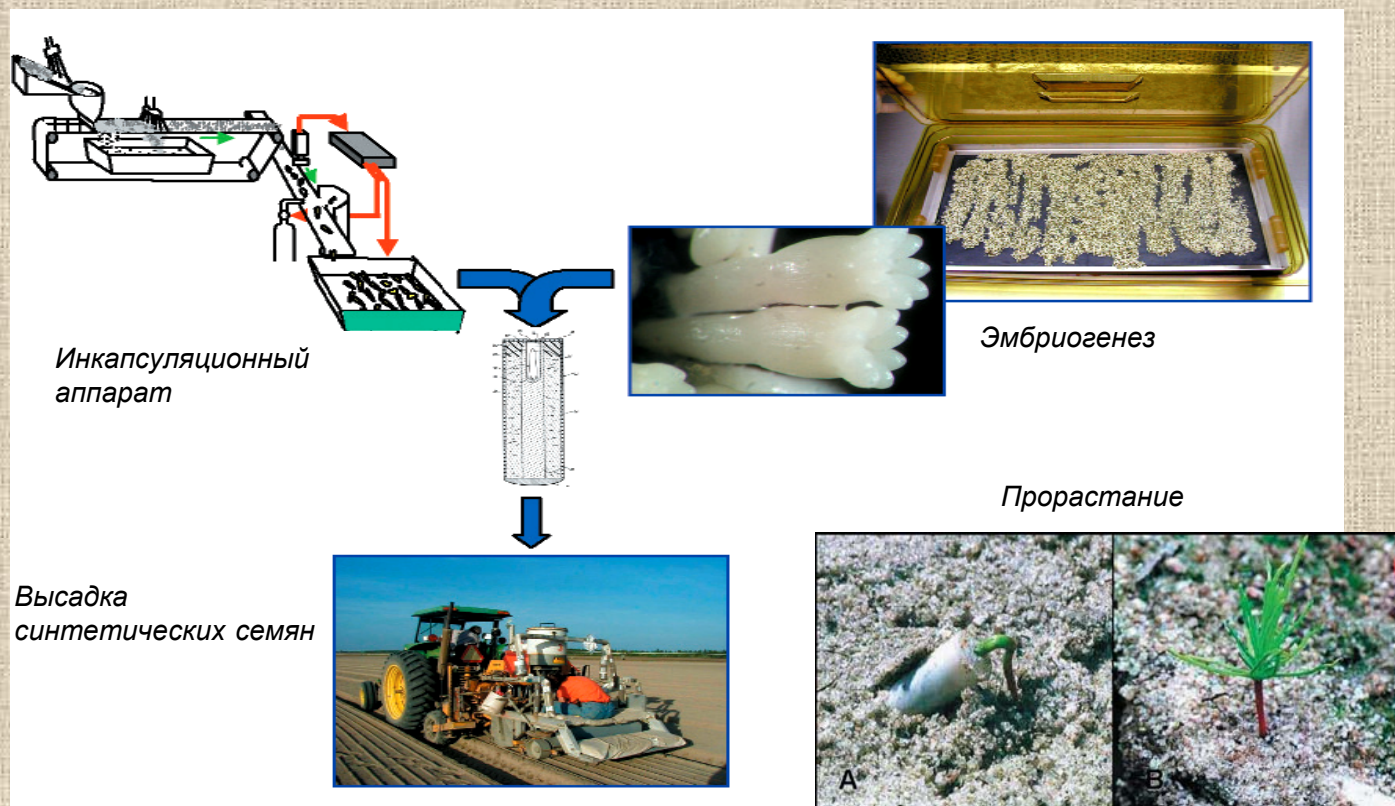
– инкапсуляция (1,2)

– проращивание (3,4)



Искусственный семенной материал хвойных пород

Weyerhaeuser Inc., USA



Микрочеренкование in vitro листовенных пород

Основные этапы:

- Отбор элитных генотипов
- Получение асептической культуры
- Омоложение
- Мультипликация
- Укоренение
- Адаптация

Ключевые параметры

- Статус плоидности маточных растений
- Возраст маточных растений
- Фитосанитарное состояние маточных растений
- Длительность периода омоложения
- Коэффициент мультипликации
- Эффективность укоренения
- Эффективность адаптации

Микрочеренкование in vitro осины

Элонгация



Микрочеренкование



Укоренение



Адаптация



Микрочеренкование in vitro березы

Омолождение



Мультипликация



Укоренение



Адаптация



Микрочеренкование in vitro ясена

Омоложение



Мультипликация



Укоренение



Адаптация



Сравнение способов размножения:

Способ размножения	Оздоровление	Сохранение гибридных свойств	Высокая производительность	Низкая себестоимость
Черенкование		✓		
Семенное			✓	✓
Микрочеренкование	✓	✓	✓	
Искусственные семена	✓	✓	✓	✓

Внедрение технологии клонального микроразмножения лиственных пород

Адаптация и доращивание клонально микроразмноженных растений осины и березы
ГУ НО «Семеновский спецсемлесхоз»



Искусственные насаждения клонольно микроразмноженных растений

*Санкт-Петербургский научно-
исследовательский институт
лесного хозяйства*

Осина, береза повислая

*Воронежский научно-
исследовательский институт
лесной генетики и селекции
лесных*

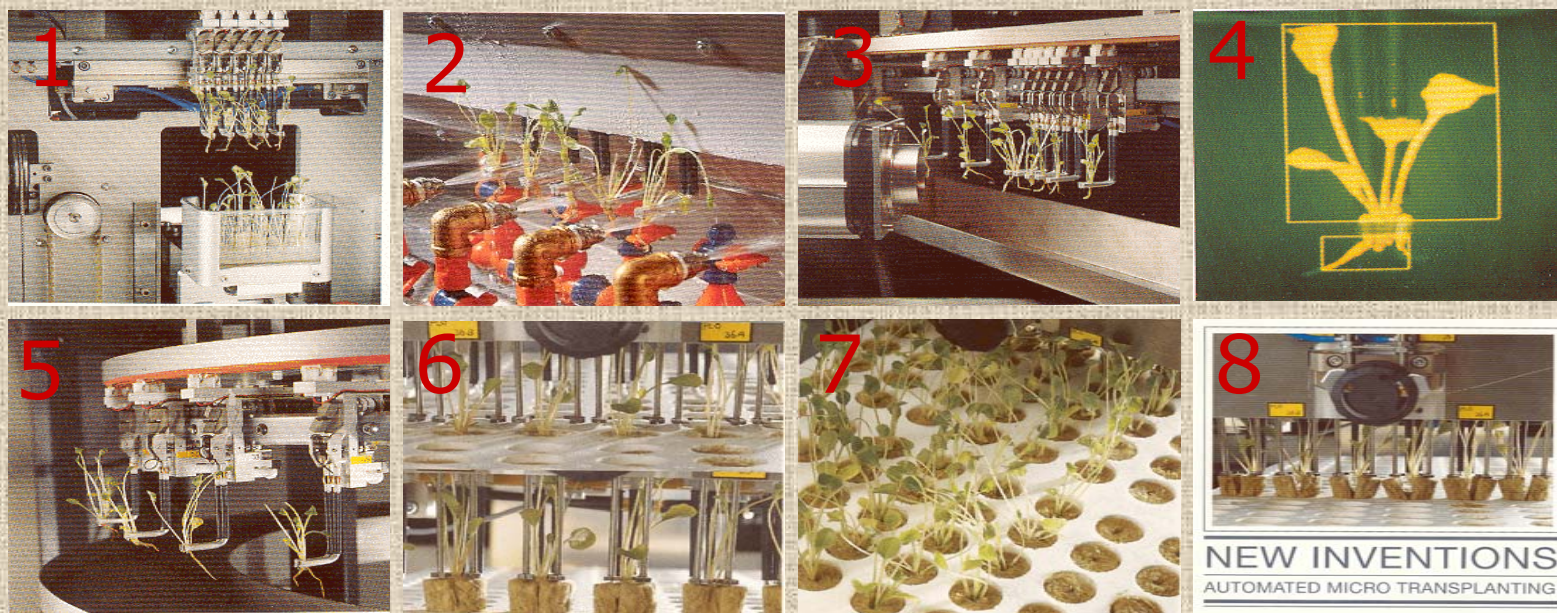
Береза карельская, осина

*Плантация березы в ФГУ
«ОЛ Сиверский лес»,
Ленинградская обл.*



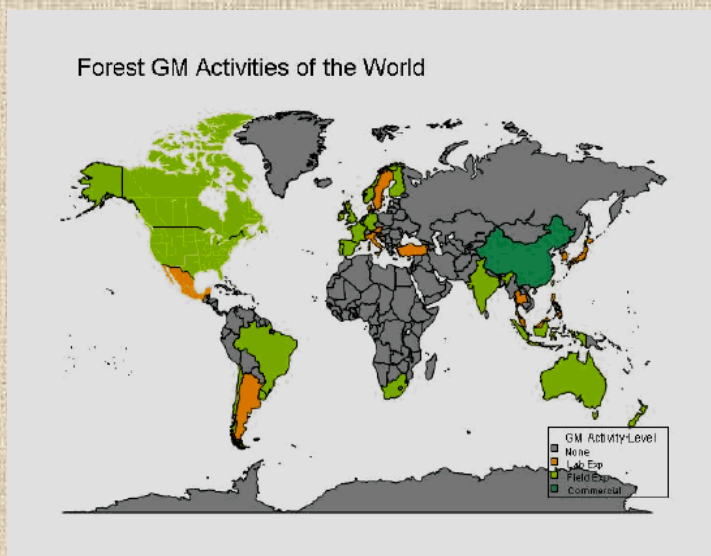
Перспектива развития:

Автоматизация клонального микроразмножения



1 – выемка микрорастений из сосуда с питательной средой; 2 – отмывка остатков питательной среды; 3, 4 – автоматическая оценка качества микрорастений; 5 – транспортировка микрорастений; 6 – процесс посадки в кассеты с торфяным субстратом; 7 – вид кассеты с микрорастениями; 8 – вид посадочной головки агрегата сбоку.

Генетическая трансформация древесных пород

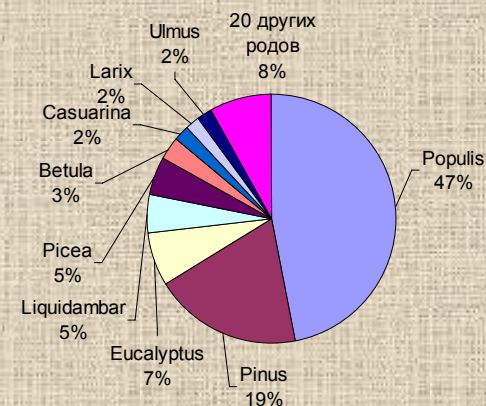


FAO, Preliminary review of biotechnology in forestry (2005):

35 стран проводят генетическую трансформацию

29 родов лесных древесных растений

Род *Populus* - почти половина всех ГМ работ



Полевые испытания ГМ деревьев

FAO, Preliminary review of biotechnology in forestry, 2005.

1988 – первые полевые испытания ГМ лесной породы (Бельгия).

Среди лесных ГМ пород:

Pinus, Picea, Eucalyptus, Populus, Betula

Основные свойства ГМ деревьев:

1 - Устойчивость к гербицидам

2 - Устойчивость к вредителям и болезням

3 - Повышенная скорость роста

4 - Модификация лигнинов

Страна	Число зарегистрированных полевых испытаний с	
	лесными породами	плодовыми и декоративными культурами
Австралия	1	2
Бразилия	2	1
Канада	7	0
Чили	3	0
Китай	9, коммерческий статус	0
Финляндия	5	0
Франция	4	0
Германия	4	1
Индия	1	0
Индонезия	1	0
Новая Зеландия	3	3
Норвегия	1	0
Португалия	1	0
ЮАР	1	0
Испания	1	0
Великобритания	6	2
США	103	47
Россия	0	8
Всего	155	64

Генетическое улучшение древесных пород

Продуктивность

- *Повышение скорости роста*
- *Компактная крона*
- *Компактная корневая система*
- *Пониженная сучковатость*
- *Улучшенное усваивание элементов питания*

Агронамические характеристики

- *Устойчивость к вредителям*
- *Устойчивость к болезням*
- *Устойчивость к абиотическим стрессам*
- *Устойчивость к гербицидам*

Свойства древесины

- *Лигнин*
- *Целлюлоза*
- *Гемицеллюлоза*
- *Влажность*
- *Экстрагируемые вещества*
- *Кора*

Биобезопасность

- *Блокирование цветения*

Селекция и анализ трансформантов осины

- Мультипликация первичных регенерантов
- Элиминация регенерантов с визуально различимыми соматональными отклонениями
- Рост и укоренение на селективной среде
- Гистохимический и ПЦР анализы
- Получено 15 трансгенных линий с геном GUS

GUS +

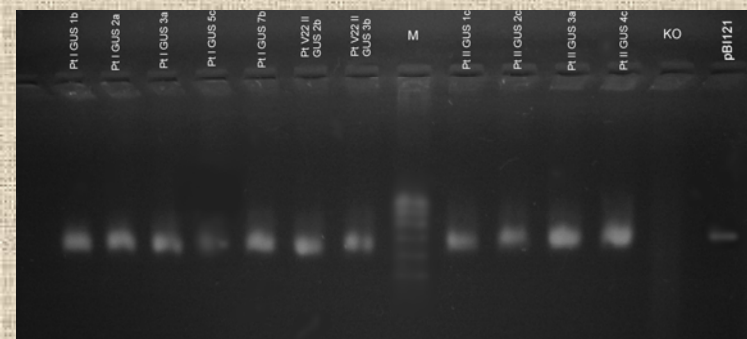


Npt II +

NptII -



ПЦР анализ трансформантов



Селекция и анализ трансформантов березы

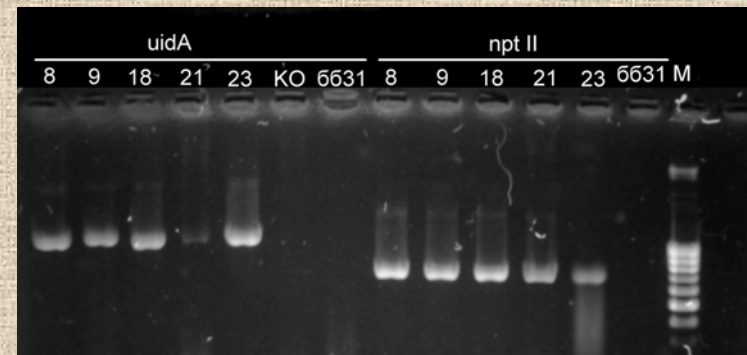
- Мультипликация первичных регенерантов
- Элиминация регенерантов с визуально различимыми соматональными отклонениями
- Рост и укоренение на селективной среде
- Гистохимический анализ
- Получено 12 трансгенных линий с геном *GUS*



GUS +



ПЦР анализ трансформантов

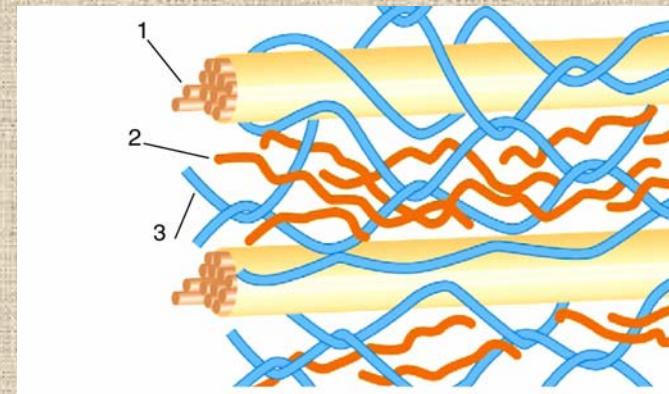


KO – вода, 8-23 – трансгенные линии, *m* – молекулярный маркер (100bp), 6631 – нетрансгенный контроль

Модификация биосинтеза лигнинов

CellFor, Canada; Syngenta, UK; INRA, France

Антисенс ингибирование генов
CAD и COMT
4-летние полевые испытания, Франция и
Великобритания
10 организаций, в том числе:
На 6 % ниже расходы по химической
делигнификации, на 3 % выше выход пульпы
Стоимость пульпы уменьшается на 15\$/м³

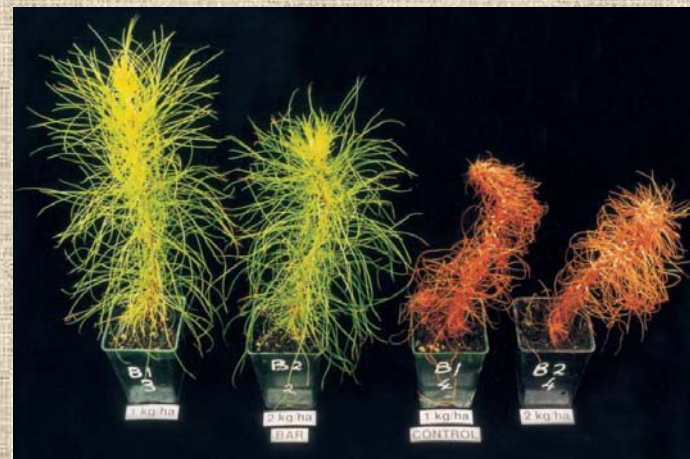


(Pilate et al., 2002)



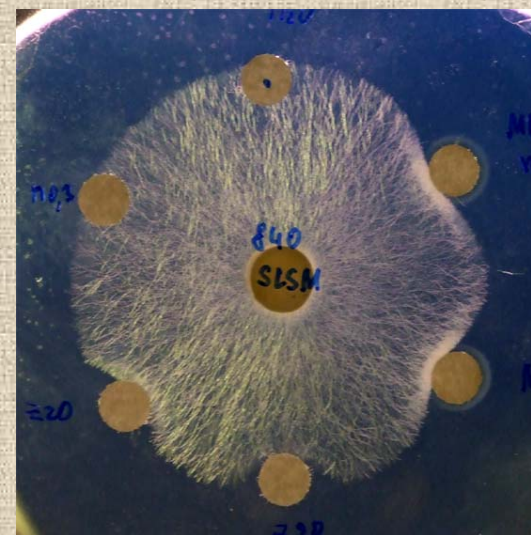
Трансгенные формы устойчивые к гербицидам

- Устойчивость к гербицидам на основе глифосата и фосфинотрицина
- Созданы трансгенные формы *Eucalyptus* sp., *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Populus* sp., *Larix decidua* и др.
- Устойчивость к гербициду у эвкалипта снижает расходы по уходу за плантациями на \$350/га в год



Повышение устойчивости к фитопатогенам

Этапы технологии	Наша технология
Анализ активности белков	In vitro тестирование активности белковых препаратов
Клонирование генов и векторов	Тауматин-подобные белки: зеаматин
Генетическая трансформация	Агробактериальный перенос
Анализ экспрессии	Western-блоттинг и ОТ-ПЦР
Анализ устойчивости к фитопатогенам	Анализ активности белковых экстрактов и развития патогенов на листовых дисках



In vitro тест
антимикробной
активности
белковых
экстрактов

Трансгенный тополь с повышенной скоростью роста

Испания, *Universidad de Málaga*

Япония, *Wood Research Institute, Kyoto University*

Трансгенные растения с геном глутаминсинтетазы GS1 и ксилоглюконазы

Полевые испытания проводятся с 2001 г., Испания

Трансгенные формы на 3-ий год испытаний превышали контроль:

на 41 % по высоте
на 36 % в диаметре

Существует 5 основных стратегий повышения скорости роста:

- Модификация биосинтеза ГК
- **Модификация метаболизма азота**
- Ингибирование экспрессии пероксидаз
- Гидролиз гемицеллюлозы
- Подавление биосинтеза лигнинов
- Экспрессия факторов транскрипции



Контроль ГМ-форма

Структура бинарного вектора с геном глутаминсинтетазы

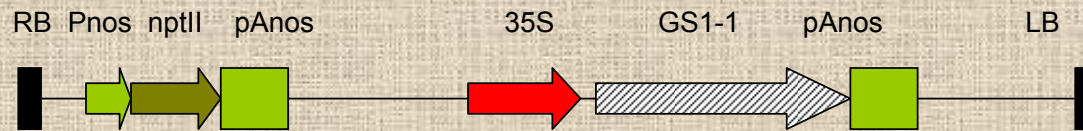
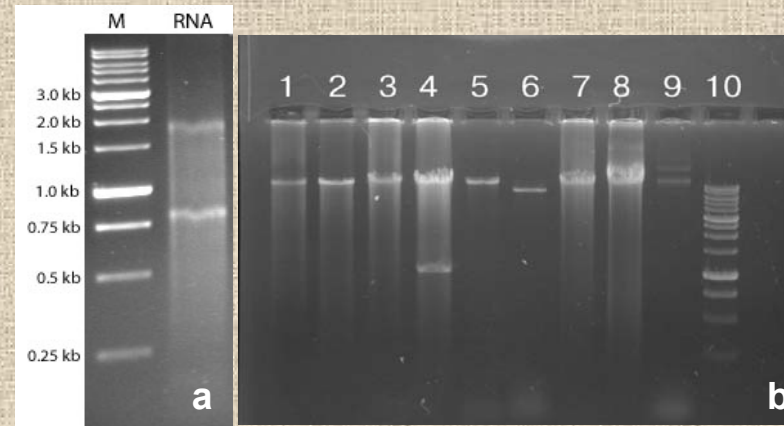


Схема Т-ДНК вектора pGS1-1, несущего ген глутаминсинтетазы

LB и RB - левый и правый фланкирующие повторы, NOS-p – промотор, а NOS-t – сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы, *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы, CaMV 35S-p промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; GS – ген глутаминсинтетазы.



Клонирование гена GS1-1

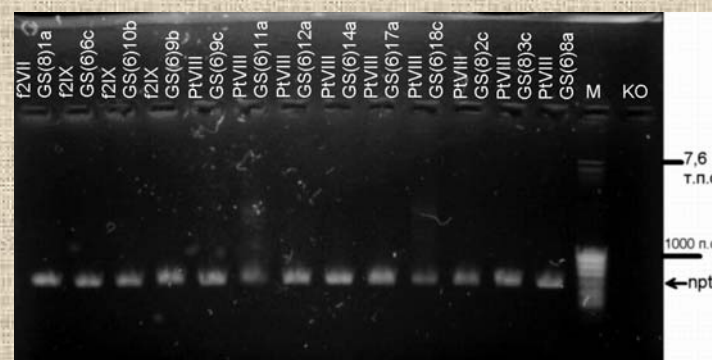
Результаты генетической трансформации осины и березы вектором pGS1-1

Вектор	Число эксплантов	Число Km+ линий	Число GS + линий	Эффективность трансформации
Осина				
pGS1-1	300	15	15	5
Береза				
pGS1-1	320	10	10	3,1

ПЦР анализ трансгенных линий с геном GS1-1



Береза повислая



Осина

Финансовая выгода от трансгенных деревьев

- *улучшение характеристик древесных волокон уменьшает стоимость переработки древесины в пульпу на 10\$/м³*
- *уменьшение количества молодых ветвей повышает количество перерабатываемой древесины, увеличивая ее стоимость на 15\$/м³*
- *уменьшение лигнина уменьшает стоимость пульпы на 15\$/м³*
- *устойчивость к гербициду у эвкалипта снижает расходы по уходу за плантациями на \$350/га*

Коммерциализация трансгенных лесных пород

Китай

*на сегодняшний день – единственная страна в мире, где существуют коммерческие насаждения трансгенных лесных пород (с 2002 года - тополь с устойчивостью к вредителям)
ведутся интенсивные работы по приданию лесным породам признаков устойчивости к засолению, болезням и модификации лигнина*

США

- эвкалипт с уменьшенным содержанием лигнина*
- холодоустойчивый эвкалипт*
- сосна лучистая с ускоренным ростом*

Бразилия

- эвкалипт с ускоренным ростом*
- эвкалипт с устойчивостью к гербицидам*

Чили

- сосна лучистая с устойчивостью к вредителям*
- сосна лучистая с уменьшенным содержанием лигнина*

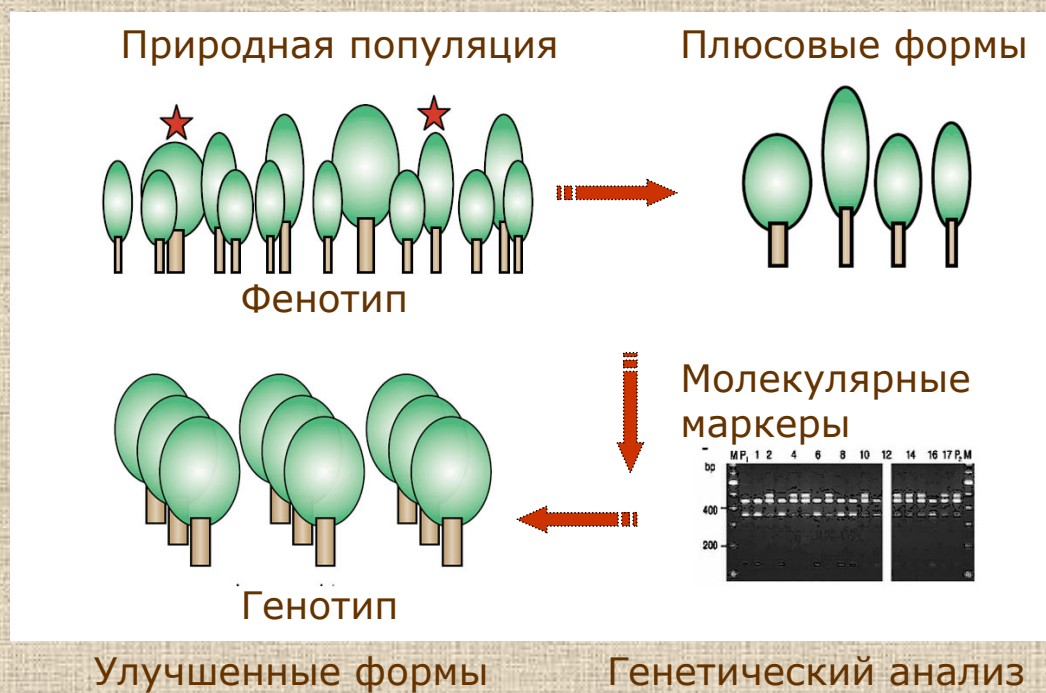
Молекулярное маркирование

Изучение биоразнообразия природных популяций

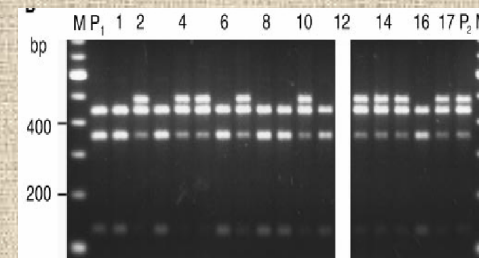
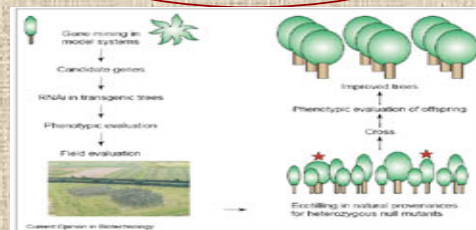
Анализ фитосанитарного состояния популяций и пиомников

Отбор генотипов по целевым признакам, генам

Проверка соответствия генотипов исходным формам



Спектр решаемых задач



Преимущества:

- ❑ *Исключается риск высадки нерайонированного посадочного материала*
- ❑ *Возможность унификации данных сертификации для создания информационной базы данных объектов ЕГСК*
- ❑ *Отбор элитных форм проводится по генотипу, что обеспечивает наследуемость признаков*
- ❑ *Высокая производительность*
- ❑ *Возможность проведения направленного скрещивания*
- ❑ *Защищенность селекционных достижений от нелегального использования*
- ❑ *Возможность проведения независимой экспертизы генетической ценности селекционных достижений*

Основные биотехнологические организации в лесном секторе

Канада

- JD Irving
- CellFor
- CFS

США

- ArborGen
- Wayerhauser
- Rayonier

Бразилия

- Bioforest
- GenFor

Евросоюз

- AFOCEL
- INRA
- Skogforsk
- SUAS

Австралия, Новая Зеландия

- Carter Holt Harvey
- Rayonier
- NZ FRI
- Rubicon



Заключение

- Существуют как экономические, экологические и научные **предпосылки успеха** биологических технологий в лесном секторе
- Можно выделить **три основных направления** биологических технологий в лесном секторе – технологии культуры *in vitro*, генетическая трансформация и молекулярное маркирование.
- На стадии **активного внедрения** технологии культуры *in vitro* и молекулярного маркирования
- На ближайшие десятилетия использование лесных возобновляемых ресурсов и их ускоренное воспроизводство методами биотехнологии рассматривается как основная **стратегия выживания**