



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Г.Ф. МОРОЗОВА»
(ФГБОУ ВО «ВГЛУ ИМЕНИ Г.Ф. МОРОЗОВА»)

НИИ «ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕСНОГО КОМПЛЕКСА»

Об инновационных технологиях в лесокультурном деле

ВОРОНЕЖ 2021

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛАБОРАТОРИИ

Лаборатория анализа ПЦР

Разработка эффективных методов размножения и хранения растений в культуре *in vitro*

Руководитель :
Евлаков П. М.
Ответственный исполнитель :
Федорова О. А.
Исполнители :
Арсеньева М. В.,
Евтушенко Н. А.,
Репникова Л. А.

Сторон. исполнители:
Гусев А.А., Исаков И. Ю.,
Попова А. А.

Фенотипирование и отбор устойчивых генотипов древесных растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам

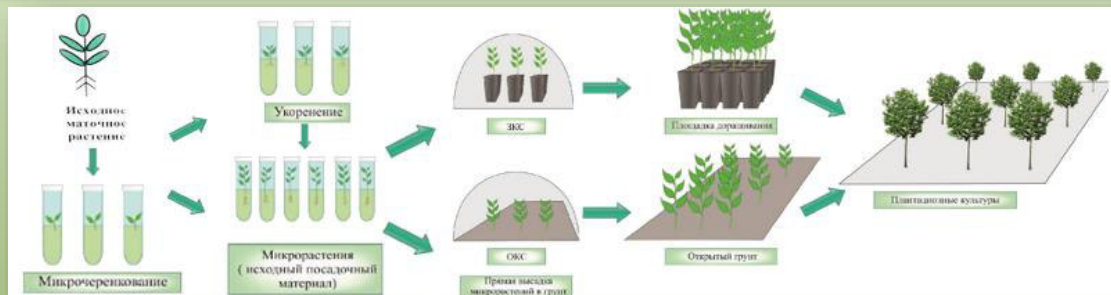
Руководитель :
Евлаков П. М.
Ответственные исполнители :
Гродецкая Т. А.,
Федорова О. А.
Исполнители :

Арсеньева М. В.,
Евтушенко Н. А.,
Репникова Л. А.,
Шаталов Р. А.
Сторон. исполнители:
Гусев А.А., Исаков И. Ю.,
Попова А. А.

Микросателлитный анализ ДНК для генотипирования и маркерной селекции растений

Руководитель :
Евлаков П. М.
Ответственный исполнитель :
Гродецкая Т. А.
Исполнители :
Федорова О. А.,
Арсеньева М. В.,
Евтушенко Н. А.,
Репникова Л. А.
Сторон. исполнители:
Шестибратов К. А., Гусев А.А., Исаков И. Ю.,
Попова А. А.

Направление 1. Разработка эффективных методов размножения и хранения растений в культуре *in vitro*



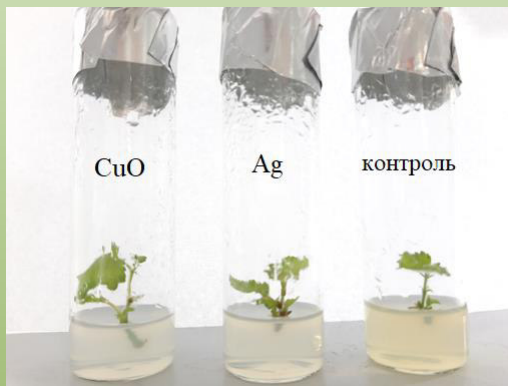
Задачи:

- ❑ Изучение процесса клонального микроразмножения генетически-ценных видов культур с учётом их биологических особенностей.
- ❑ Подбор питательных сред с различным составом минеральных солей и регуляторов роста для различных этапов клонального микроразмножения.
- ❑ Подбор ламп с преобладанием излучения в различных частях спектра с целью интенсификации процесса размножения и укоренения побегов плодовых культур.
- ❑ Разработка нанобиотехнологических подходов для повышения эффективности клонального микроразмножения древесных пород, в т.ч. за счет подавления развития фитопатогенных микроорганизмов, а также применения достижений биосенсорики и тканевой инженерии в сфере лесных биотехнологий.
- ❑ Разработка индивидуальных протоколов клонального микроразмножения генетически-ценных видов растений с учетом их видовых и сортовых особенностей.

Выполнено:

- ❑ цикл работ по Федеральной целевой программы совместно с Тамбовским государственным университетом им. Г.Р. Державина;
- ❑ госконтракт «Разработка технологических решений интенсивного восстановления лесов на основе микроклонирования *in vitro* с использованием нанотехнологических подходов для обеспечения длительного стабильного сохранения перспективных генотипов лиственных древесных пород, устойчивых к фитопатогенам» под руководством Матвеева С. М.
- ❑ госконтракт №Ф2019.05723 с Агентством Инноваций и экономического развития Воронежской области «Применение постгеномных технологий для микроклонального размножения ценных генотипов древесных пород и ускоренного лесовосстановления и лесоразведения в условиях лесостепной зоны Воронежской области» (6,0 млн. рублей).
- ❑ 2 хозяйственных договоров с ООО «ЦентрСвет» и ООО «Маяк» на общую сумму 211,0 тыс. руб.

В лаборатории проводятся исследования по усовершенствованию технологии клонального микроразмножения древесных растений с использованием наночастиц оксида меди и серебра



Использование наночастиц CuO и Ag в составе среды WPM в концентрации 5 мг/л на этапе введения эксплантов березы пушистой в культуру *in vitro* за счет снижения на 15-25% инфекционной нагрузки способствует повышению количества стерильных микроклонов, а также ускорению их морфогенеза.

Степень развития основного пазушного побега на первичных эксплантах березы на 30-й день от начала культивирования в зависимости от содержания наночастиц в питательной среде WPM



Применение наночастиц на этапе перевода растений в условия закрытого грунта способствует снижению количества инфицированных фитопатогенами растений березы на 5 – 10% и повышению их приживаемости на 10 – 30%. Снижение общей инфекционной нагрузки способствует также улучшению основных показателей роста и развития растений березы.

Микрорастения березы через 21 день после перевода в условия закрытого грунта

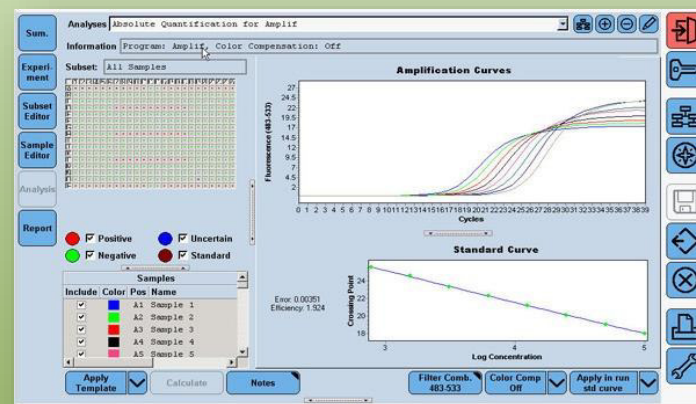
Низкие показатели инфицированности введенных эксплантов на питательных среды с наночастицами оксида меди и серебра, а также микрорастений при переводе в условия закрытого грунта связаны с антибактериальным и антифунгальным действием растворов наночастиц.



Отмечен значительный антифунгальный эффект растворов наночастиц I в отношении *Fusarium oxysporum* (диаметр зоны подавления роста гриба $d=16$ мм), *Alternaria alternate* ($d=13$ мм), а также наночастиц II в отношении *Fusarium avenaceum* ($d=20$ мм) и *Alternaria alternata* ($d=12$ мм).

В настоящее время в лаборатории в рамках выполнения проектов по линии «Умник», проводятся исследования по подбору оптимальных концентраций наночастиц оксида меди и серебра с целью использования их на этапах мультипликации и укоренения растений *in vitro*.

Направление 2. Фенотипирование и отбор устойчивых генотипов древесных растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам



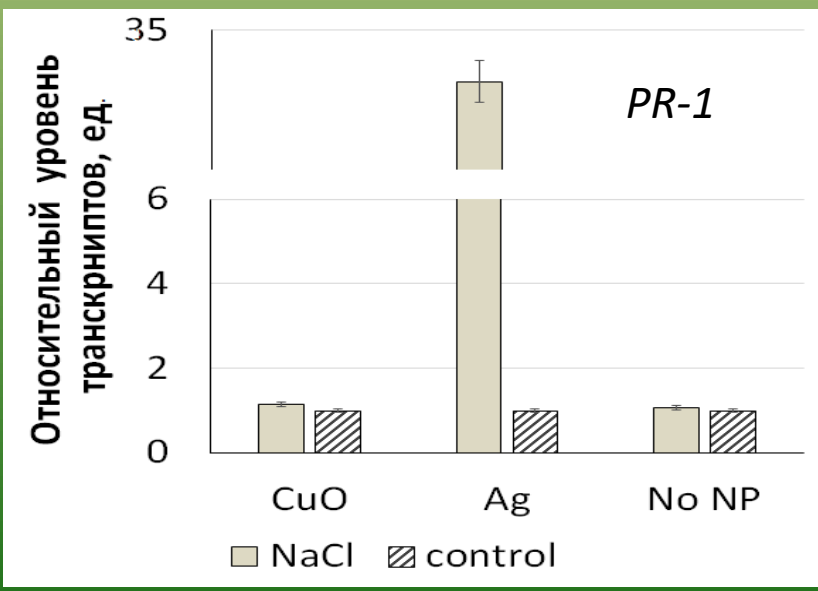
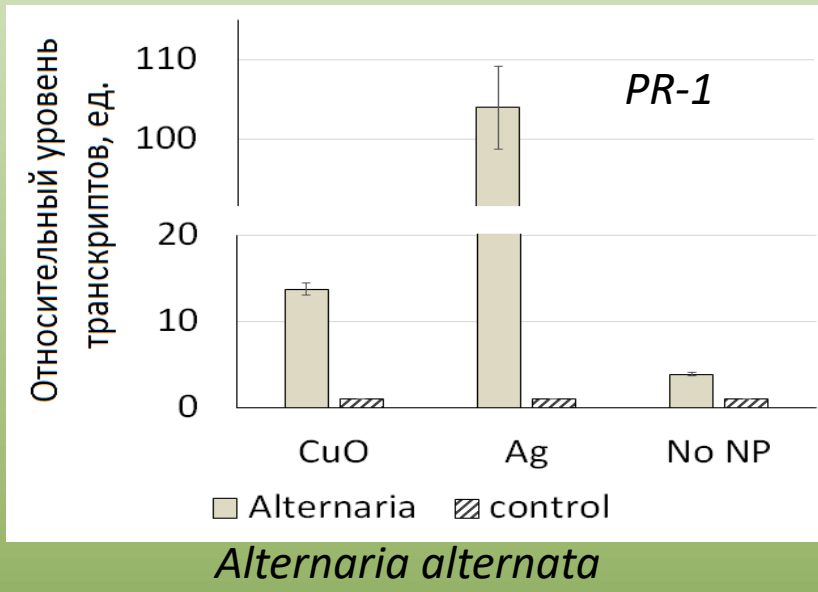
Задачи:

- ❑ Поиск маркерных генов устойчивости, характерных для данного вида растения
- ❑ Подбор и апробацию специфических праймеров к генам стрессоустойчивости; оптимизацию условий проведения ПЦР
- ❑ Исследование экспрессии генов устойчивости методом ПЦР в реальном времени
- ❑ Отбор устойчивых генотипов на основании результатов исследования экспрессии генов стрессоустойчивости
- ❑ Идентификация основных фитопатогенов с использованием программного обеспечения, создание коллекции культур.

Выполнено:

- ❑ Проведено выявление и отбор, тестирование в условиях *in vitro* устойчивых к влиянию абиотических факторов среды (засуха) селекционно-ценных генотипов березы и тополя
- ❑ Исследовано влияние наночастиц на приживаемость клонов березы и тополя в культуре *in vitro*, их морфологические и молекулярно-генетические характеристики
- ❑ Исследовано влияние наночастиц на адаптацию *in vitro* клонов отобранных по признаку устойчивости генотипов березы и тополя к воздействию абиотических и биотических стрессовых факторов в рамках госконтракта «Применение постгеномных технологий для микрклонального размножения ценных генотипов древесных пород и ускоренного лесовосстановления и лесоразведения в условиях лесостепной зоны Воронежской области»

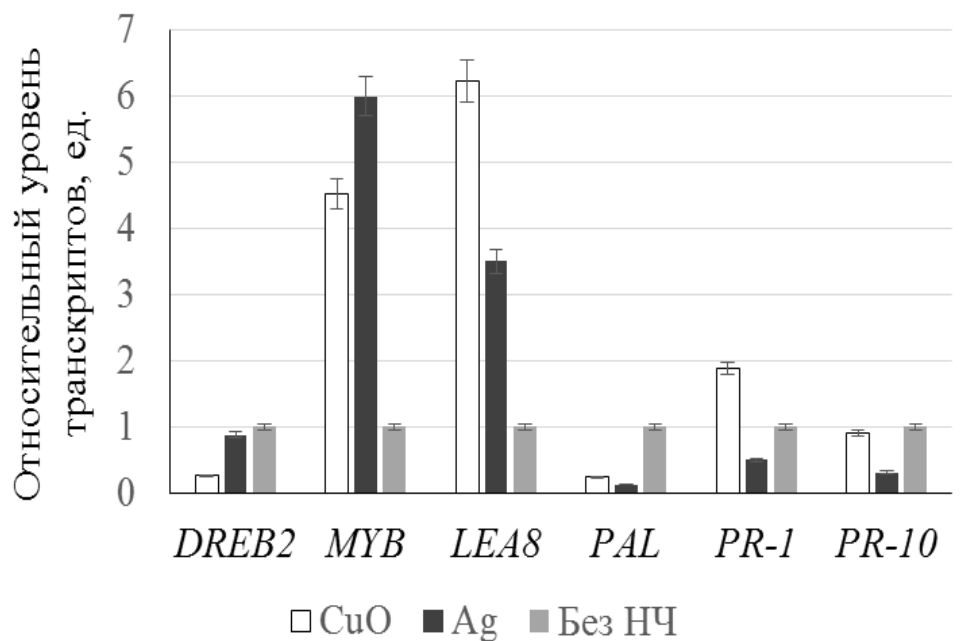
Исследование экспрессии генов устойчивости у *in vitro*-клонов тополя при воздействии биотического и абиотического стресса



NaCl

Проводится исследование экспрессии маркерных генов устойчивости *asr3*, *icdh*, *PR-1*, *PR-10*, *DREB2* у микроклонов. Выявленное увеличение уровня транскриптов при воздействии NaCl и *Alternaria alternata* свидетельствует о развитии адаптивных механизмов у *in vitro*-клонов тополя

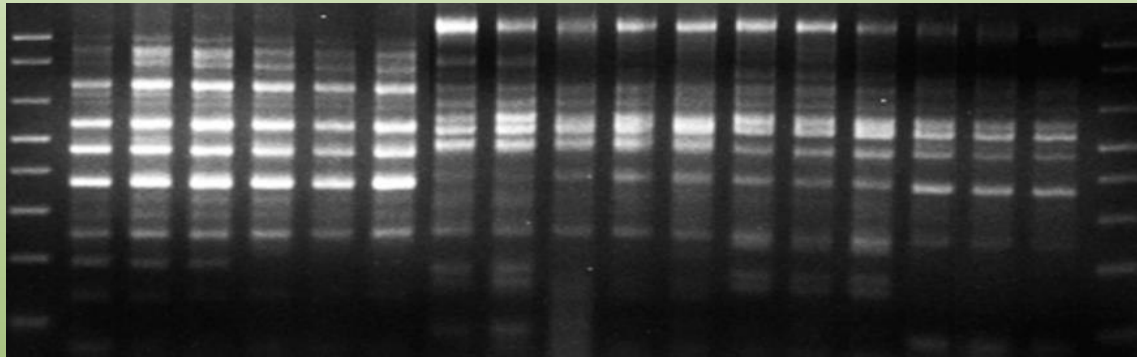
Влияние наночастиц на экспрессию генов устойчивости у *in vitro* клонов



Внесение наночастиц CuO и Ag в среду культивирования оказывает стимулирующее воздействие на экспрессию генов устойчивости, что повышает адаптивную способность микроклонов тополя и березы к воздействию абиотического и биотического стресса

Экспрессия генов стрессоустойчивости у *in vitro* клонов березы

Направление 3. Генотипирование и маркерная селекция растений на основе микросателлитного анализа ДНК

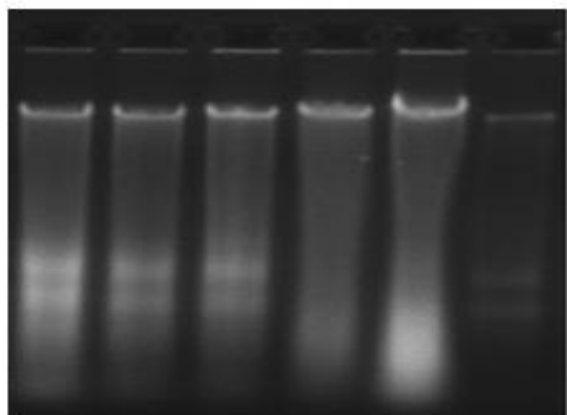


Еще одним приоритетным направлением является молекулярно-генетическая идентификация (паспортизация) лесных древесных видов растений. Для идентификации, определения структуры популяций и ее динамики; анализа филогенетических взаимоотношений лесных древесных видов растений широко применяется метод молекулярного маркирования. Одними из эффективных ДНК-маркеров являются микросателлитные (SSR) последовательности ДНК. Микросателлиты широко распространены в ядерных геномах, где они встроены в уникальные последовательности ДНК, что обуславливает полиморфизм особей внутри одного вида. Данные характеристики SSR-маркеров обуславливают их высокую информативность, что позволяет проводить точную видовую идентификацию.

Задачи:

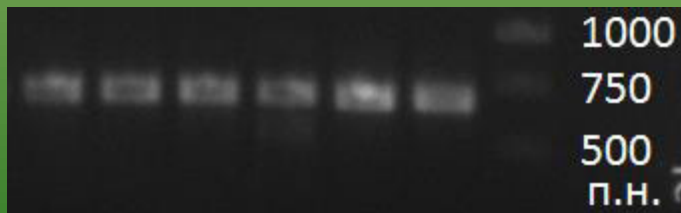
- Поиск полиморфных микросателлитных локусов, характерных для данного вида, подбор специфических праймеров
- Оптимизация и проведение ПЦР с праймерами к SSR-локусам
- Детекция продуктов амплификации
- Составление генетического паспорта на основе полиморфизма ПЦР-продуктов

Молекулярно-генетическая идентификация образцов дуба

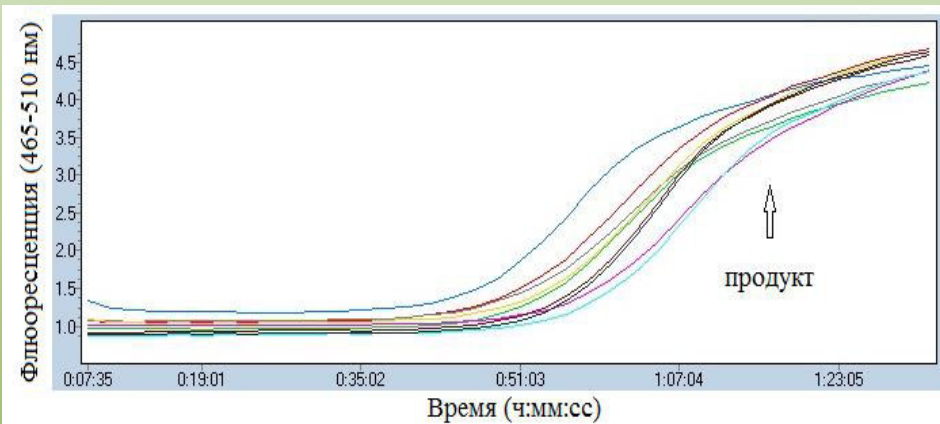


1 2 3 4 5 6

Образцы ДНК 1-*Q. robur*
Pyramidalis, 2-*Q. robur*
(Дагестанский), 3-*Q. rubra*, 4-
Q. Pubescens, 5-*Q. mongolica*,
Q. castaneifolia



ПЦР-продукт

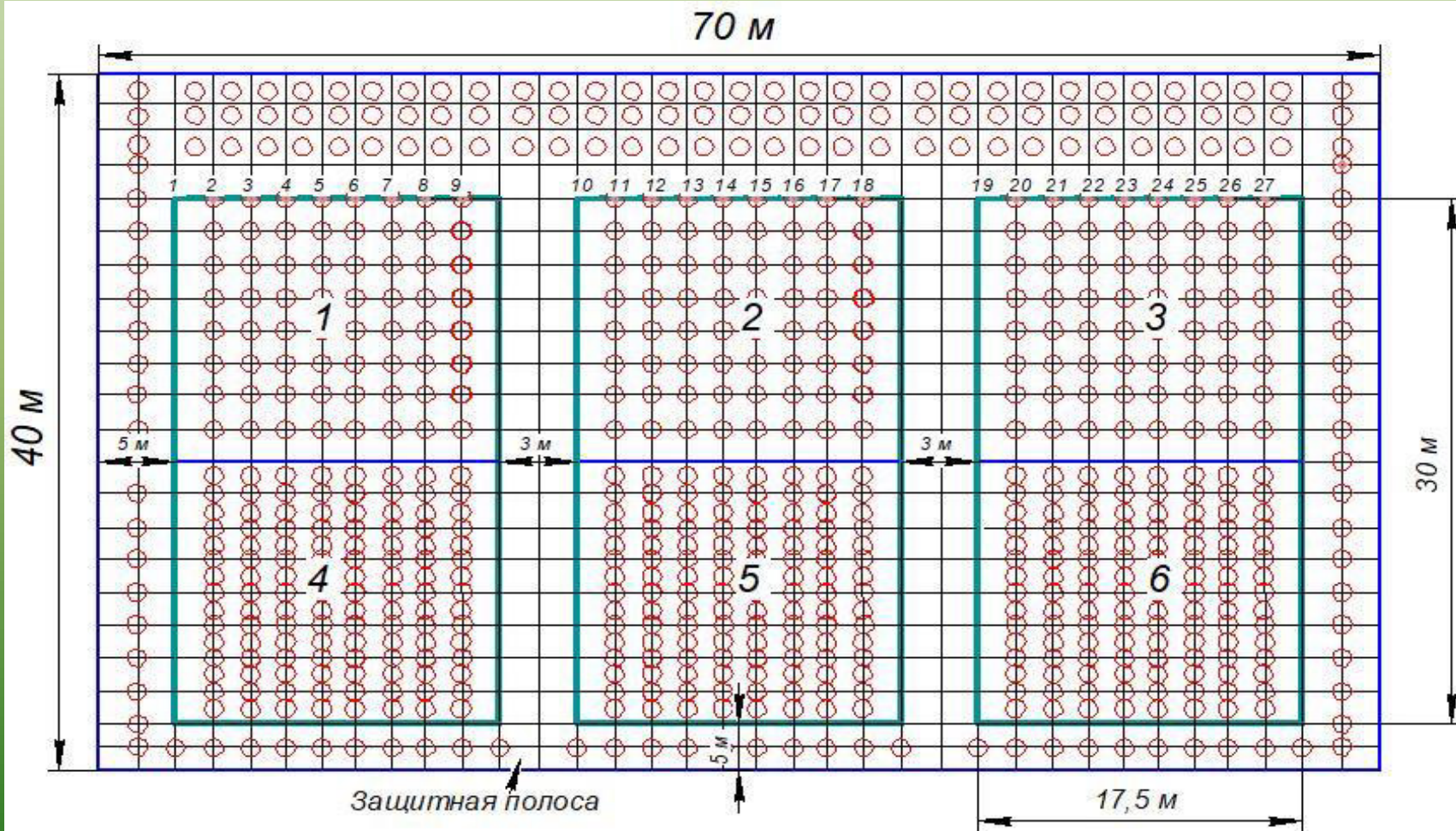


ПЦР-амплификация с праймерами к генам ITS и MatK (45-46) проводилась с целью идентификации образцов дуба, относящихся к различным видам и различным по географическому происхождению

Целевые показатели лаборатории за 2020 год

| Целевые показатели | План | Факт |
|--|--------------|---------------|
| Число статей, в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science Core Collection (WoS) | 0 | 2 ед. |
| Число статей, в изданиях, индексируемых в базе данных Scopus | 1 | 1 ед. |
| Число статей ВАК | 2 | 4 ед. |
| Число статей в международных конференциях | 3 | 4 ед. |
| Число статей в российских конференциях | 2 | 1 ед. |
| Объем научной, инновационной и высокотехнологичной производственной продукции | | 3,6 млн. руб. |
| Объем доходов от научно-исследовательской деятельности для реального сектора экономики | 200 тыс. руб | 343 тыс. руб |
| Подготовка заявок на участие в НТП, конкурсах грантов и т.п. | 2 | 4 ед. |
| Количество проведенных экспертиз с выдачей соответствующих экспертных (аналитических) заключений | 4 | 4 ед. |
| Количество проведенных экскурсий | 5 | 10 |
| Количество проведенных мастерклассов | 1 | 1 |

План-схема закладки калибровочного карбонового полигона



Калибровочный карбоновый полигон



Исходные характеристики древесных пород на начало закладки калибровочного карбонового полигона

| Вариант опыта | Высота растения, см | Диаметр стволика, мм | Сырая масса растения, г | Сухая масса растения, г | Оводнённость, % |
|----------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| Береза повислая УГ-1 | 31.4±1.83 | 4.6±0.16 | 10.5 ± 0.88 | 3.2 ± 0.27 | 69.9 ± 0.50 |
| Береза пушистая 15-1 | 29.8 ± 2.32 | 4.6 ± 0.15 | 9.2 ± 0.71 | 2.8 ± 0.22 | 69.6 ± 0.44 |
| Береза повислая Контроль | 36.5 ± 1.44 | 3.8 ± 0.14 | 5.6 ± 0.45 | 1.95 ± 0.15 | 64.9 ± 0.72 |
| Сосна обыкн. ЗКС | 14.8 ± 0.82 | 3.5 ± 0.15 | 6.5 ± 0.48 | 2.1 ± 0.17 | 67.7 ± 1.07 |
| Сосна обыкн. ОКС | 16.0 ± 0.72 | 3.3 ± 0.12 | 6.2 ± 0.53 | 2.7 ± 0.25 | 56.5 ± 1.32 |
| Лиственница ЗКС, Контроль | 48.3 ± 2.09 | 9.3 ± 0.27 | 39.4 ± 2.4 | 16.6 ± 1.01 | 57.8 ± 0.66 |
| Осокорь, черенки, Контроль | ГОСТ | ГОСТ | 7.2 ± 0.46 | 3.7 ± 0.24 | 47.3 ± 3.2 |
| Э.С.-38, черенки | ГОСТ | ГОСТ | 4.3 ± 0.17 | 2.5 ± 0.09 | 40.6 ± 3.51 |
| Сакрау, черенки | ГОСТ | ГОСТ | 4.1 ± 0.21 | 2.3 ± 0.11 | 44.0 ± 3.12 |
| ПОК, черенки | ГОСТ | ГОСТ | 4.2 ± 0.2 | 2.3 ± 0.11 | 43.6 ± 2.64 |
| Тополь 'Ведуга', ЗКС | 81.6 ± 3.33 | 8.5 ± 0.26 | 43.7 ± 3,49 | 14.2 ± 1,35 | 68.0 ± 0.53 |



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!