
Геномные технологии для лесопромышленного комплекса

Елена Кирилловна Потокина, д.б.н.,
СПбНИИЛХ, профессор СПбГЛТУ,
Центр Агро Технологий Сколтеха

Геномные технологии для лесопромышленного комплекса

- Разработка молекулярных маркеров для отбора деревьев с нужными признаками
- Получение новых клонов с измененными признаками методом геномного редактирования

Поиск генов, ответственных за формирование хозяйственно-ценных признаков

Метод Сэнгера vs NGS Illumina

Чувствительность / предел обнаружения (LOD)

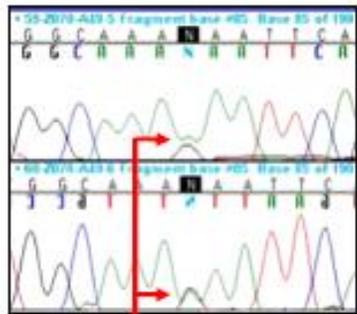
Метод Сэнгера

Предел обнаружения (LOD) ~20%

Molecular Pathology Checklist (программа аккредитации CAP)

“У метода секвенирования по Сэнгеру предел обнаружения мутантных аллелей составляет 20%, что, как правило, соответствует 40% наличию мутантно-положительных клеток в образце.”

- Коллегия Американских Патологов (CAP)



A
G

NGS

Предел обнаружения (LOD) ~ 3-5%

Покрытие	30X	100X	1,000X	10,000X
A	28 – 29	95 – 97	950 – 970	9500 – 9700
G	1 – 2	3 – 5	30 – 50	300 – 500
Предел обнаружения	~3 – 6%	3 – 5%	3 – 5%	3 – 5%

```
AAAACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
AAACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
AACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
ACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
ACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
CCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
GAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
CTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
TAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
AGCACCTTCTCATCAGGACGAG
CCCTTCTCATCAGGACGAG
ACCTTCTCATCAGGACGAG
CTTCTCATCAGGACGAG
ATCAGGACGAG
ATCAGGACGAG
TCAGGACGAG
GAGCAGGACGAG
GAGCAGGACGAG
AAGCCTTGCCTTGGCTAGGCTGACATCGGGACC
AAGCCTTGCCTTGGCTAGGCTGACATCGGGACC
AAAACCAGAGTCTAGCACCTTCTCATCAGGACGAG
```

A
G

Генотипирование – секвенированием: Genotyping by Sequencing, GBS

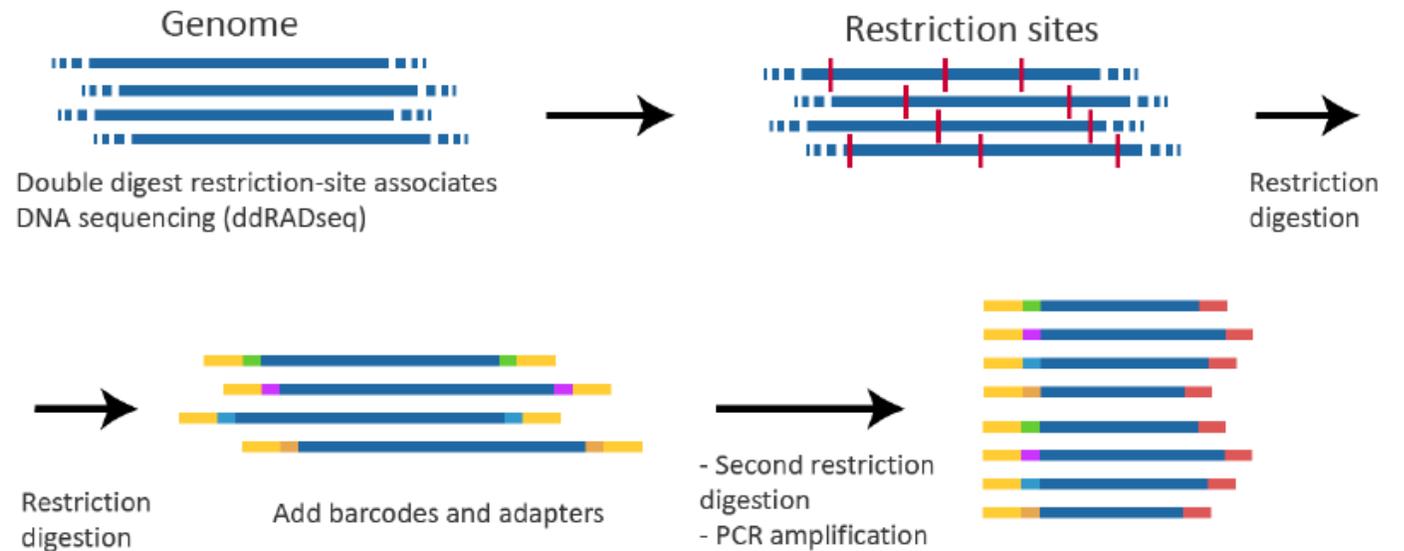


Experimental material

74 samples of 2 hybrid populations.

Data were obtained by ddRADseq (short-read sequences).

HindIII and NlaIII restriction enzymes used.



192 генотипа любого растения ~ 500 млн чтений с Illumina Hseq2500

Table 1: Number of reads across library 1 samples

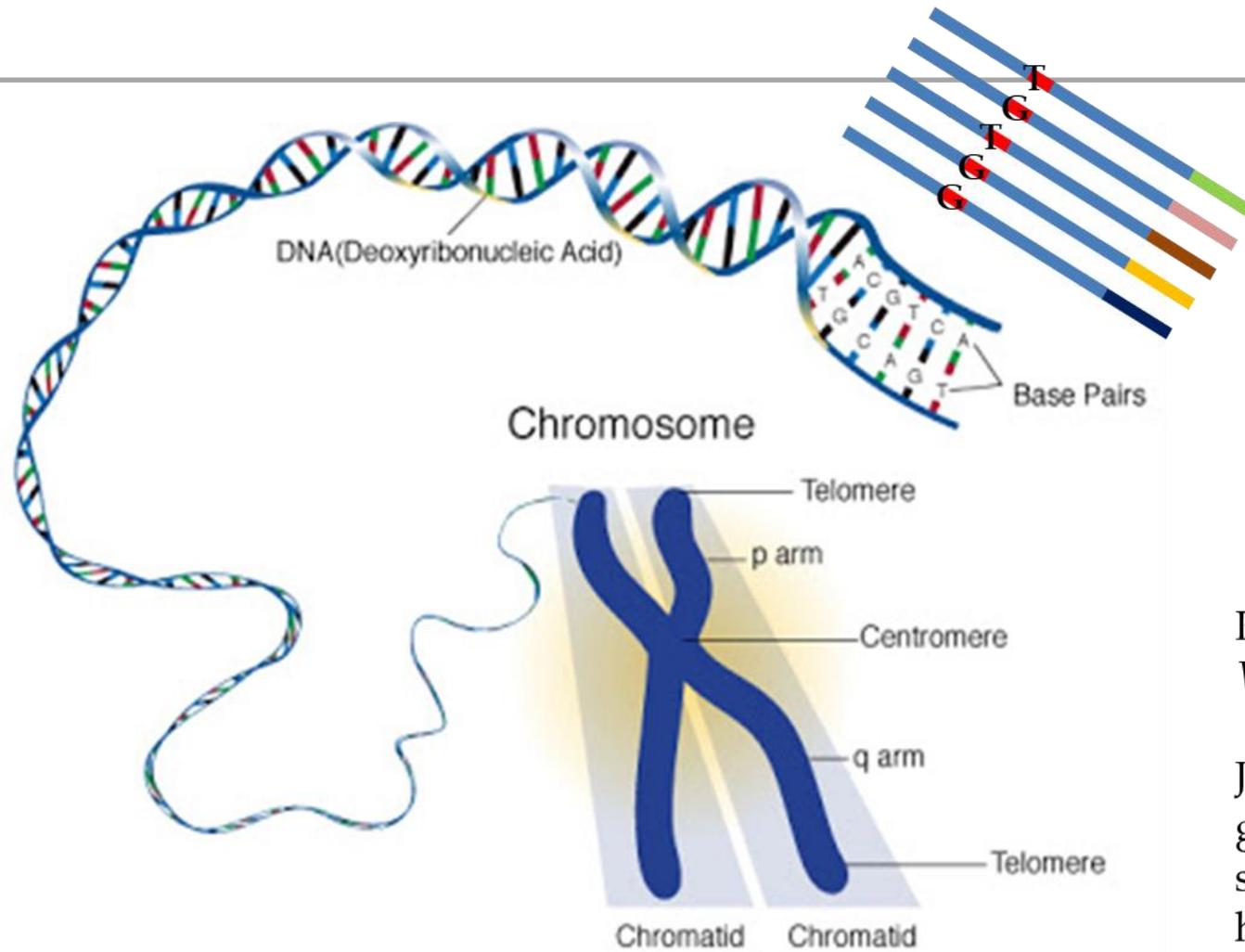
2325148	1699352	1937588	2053219	2584845	1624848	2812301	2944046	2098975	2827171	2960267	2886723
2987665	1870804	2174159	2523540	2251049	2114210	2611772	2057819	2272910	2938771	3659037	3242197
1948706	1942226	2796093	2846570	1425547	2168198	2780991	3125542	2318286	2170707	2507141	2628956
2011298	2090163	2015656	3048936	3606855	2480931	2507273	3316336	2470395	2119654	2351215	1838558
2268939	2531993	3004855	3261177	2035971	1390995	2111688	2975365	2391821	2552845	2302836	2867425
1441818	2543237	2635035	2671791	3211772	2443984	2092667	2605624	2911408	2328775	2901035	2748885
1987600	1692433	1984170	2126638	2261338	1852982	2954797	2405013	2249451	1617135	2929064	4362856
2324208	1788270	2971261	1718756	2442592	2616817	2730446	2843143	2287028	3033249	2865882	3782040

Table 2: Number of reads across library 2 samples

1689381	2217654	2324446	1979193	3760484	1818859	2808085	3380011	3517447	2475937	2124971	2979982
1792779	1838734	2296490	3212373	1408692	2641516	953616	2927696	2927778	4728089	5923191	2283464
2076299	2363422	1945945	2825005	1340106	2725939	1483111	2286622	4203350	2022468	1711310	3204135
1738163	2579239	1881385	3156426	3154911	1578634	2531413	2200222	2699230	1111496	3328663	3762556
2175232	2069347	2242250	1958490	3559593	1751176	1516573	3780969	4224751	1824420	2016942	4825329
1236581	1966568	2630021	1723330	1931431	3000303	2187986	2479236	2580457	2393902	4882805	3424450
1683004	1641330	2351437	2175364	903952	1190317	3695014	1903347	2019342	2580687	2294087	1493381
2139549	1468634	2444920	1318325	2335003	2854514	2413427	2631344	3047076	2255352	5419082	3522582

Illumina sequencing data: Library 1, 96 samples, 239,696,783 reads
Library 2, 96 samples, 241,459,089 reads

Поиск SNP – “SNP calling” procedure



Reference genome
Vitis vinifera 12x:

Jaillon, O. et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463–467 (2007).

Исследование геномного участка, связанного с «карельским» фенотипом березы

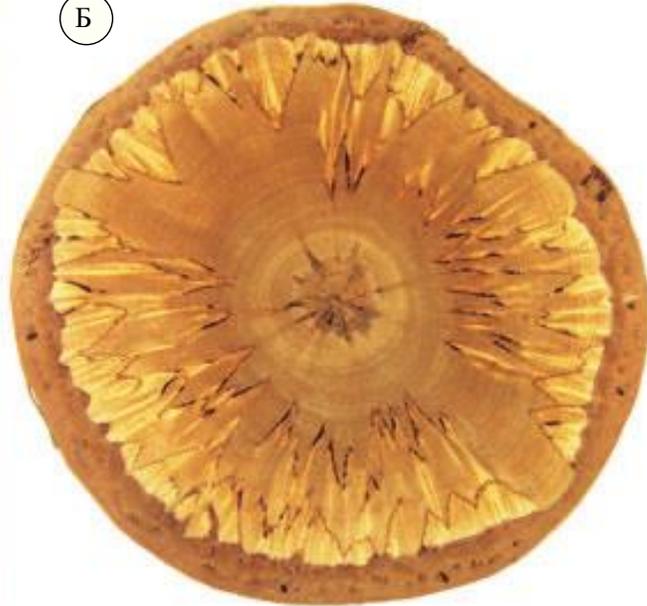


Древесина карельской березы ценится благодаря узорчатой структуре, что обуславливает ее высокую стоимость

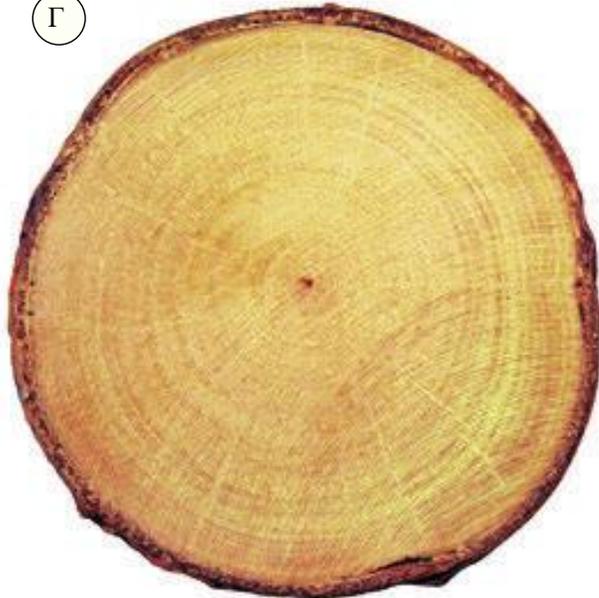




Б



Г



Разработка молекулярных маркеров для отбора деревьев с нужными признаками

Карельская береза - особая разновидность Березы повислой

Curly (Karelian) birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti)

Волокна древесины карельской березы направлены под разными углами, что приводит к формированию узорчатой древесины

Table 1. Results of curly birch crosses tested against major hypotheses of progeny phenotype ratios under a one-locus model.

Curly selfings

Female	Male	n ^a	Surv% ^b	Curly% ^c	Expected ratio 2:1		Expected ratio 3:1	
					χ^2	p	χ^2	p
E4804	E4804	12	58.3	42.9	1.786	ns	3.857	<0.05
E4805	E4805	23	73.9	47.1	2.941	ns	7.078	<0.01
E4810	E4810	60	93.3	58.9	1.509	ns	7.714	<0.01
E6539	E6539	60	75.0	55.6	2.500	ns	9.074	<0.01

Simple inheritance of a complex trait: figured wood in curly birch is caused by one semi-dominant and lethal Mendelian factor?

K. Kärkkäinen, A. Viherä-Aarnio, P. Vakkari, R. Hagqvist, and K. Nieminen

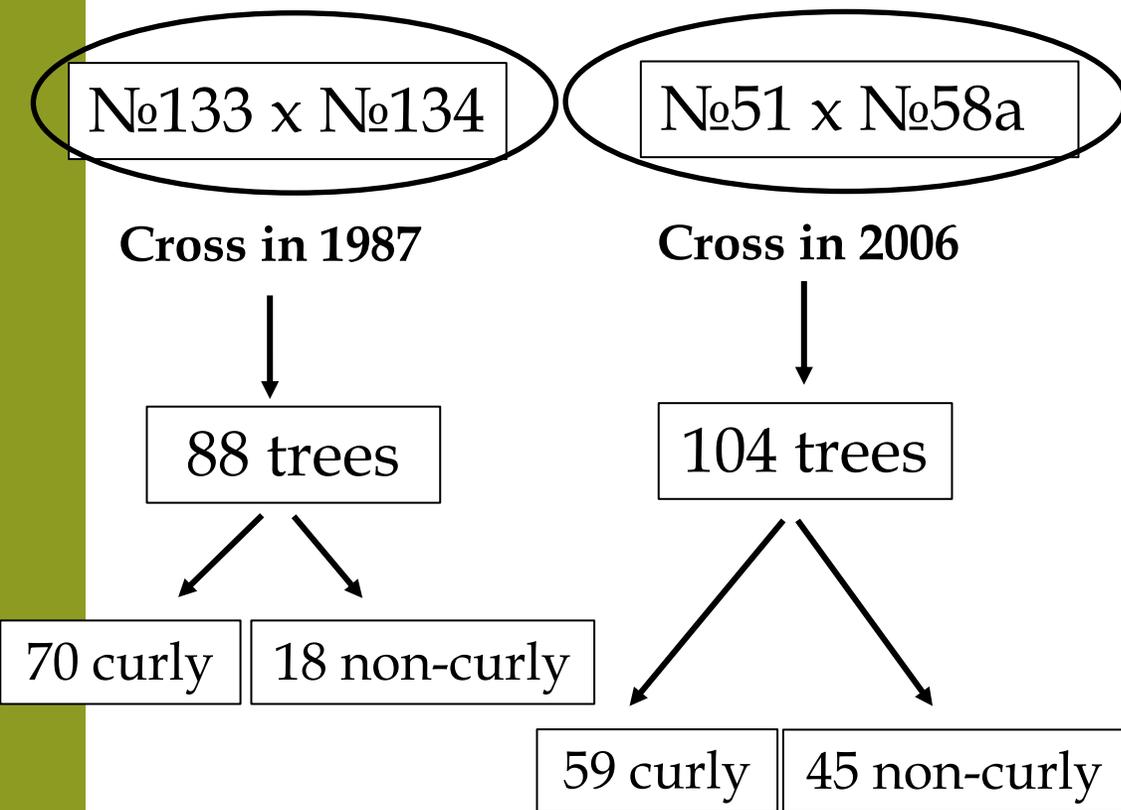


Узорчатость древесины – моногенный признак?

“На основе анализа расщепления в популяциях от искусственных скрещиваний мы постулируем простую менделевскую модель наследования узорчатости древесины:

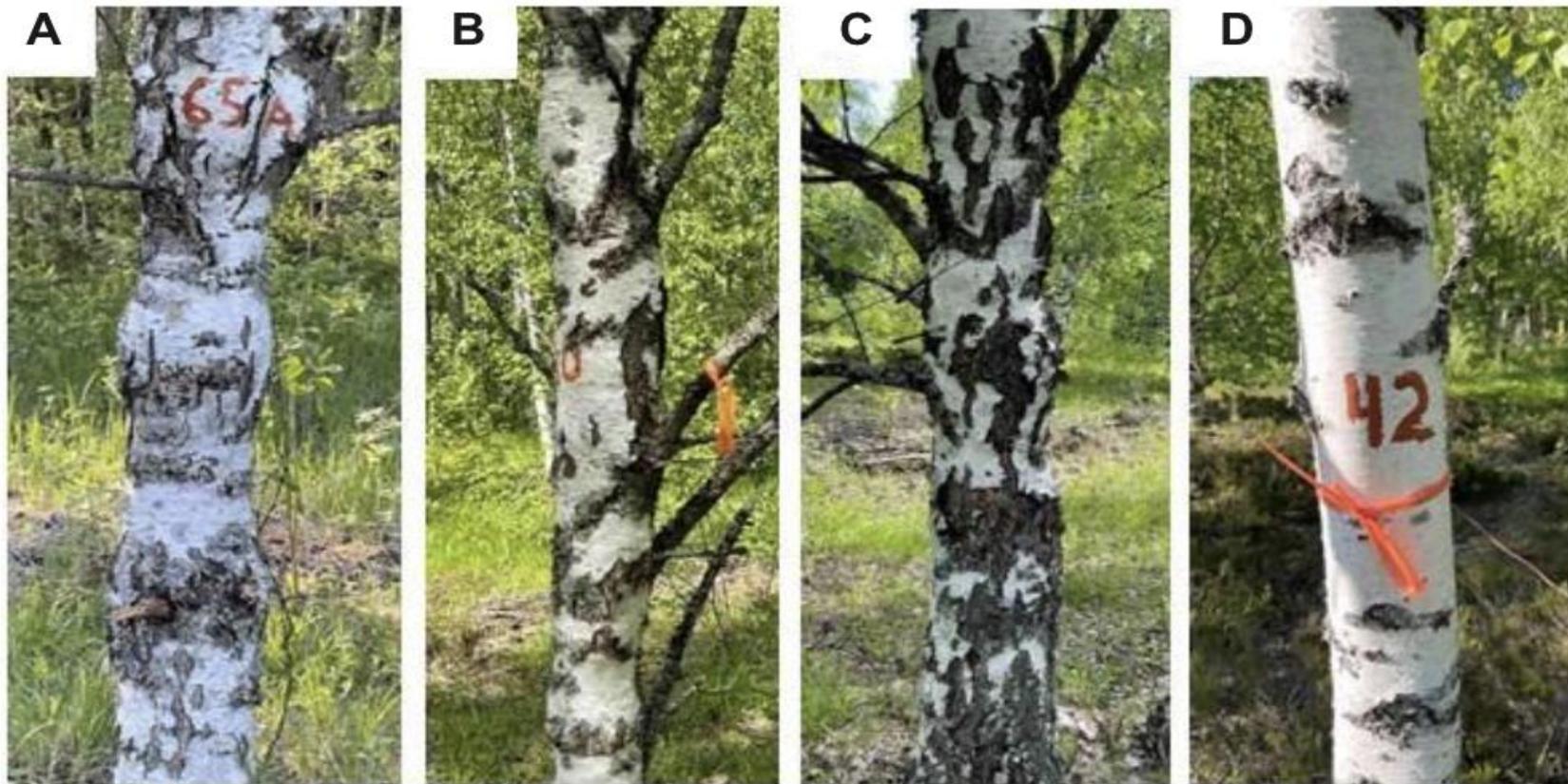
Один локус, два аллели, причем аллель, кодирующий кудрявый фенотип, доминирует над аллелем, кодирующим нормальный фенотип

Материал исследования: 192 дерева от двух контролируемых скрещиваний между карельскими березами



Плантация Института леса Карельского научного центра Российской академии наук (Петрозаводск)

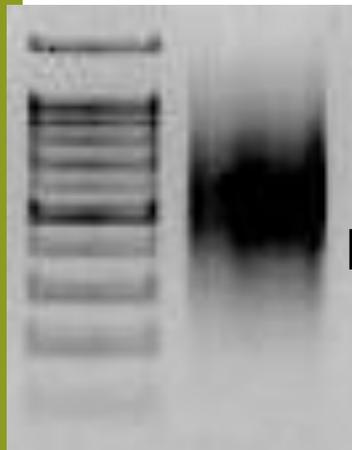
«Карелистость» при фенотипировании деревьев определялась по их форме и наличию характерных выпуклостей на их поверхности без проведения спилов



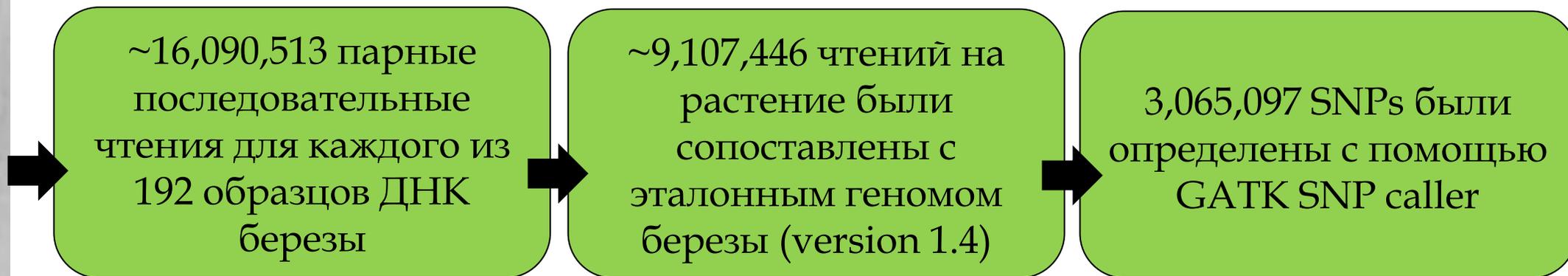
Типы поверхности ствола:

шаровидно-утолщенная (А), мелкобугорчатая (В), «вздутая» (С) и без признаков «карелистости» (D). Типы поверхности ствола А, В и С рассматривались как «карельский» фенотип, D - как «не карельский» фенотип.

Генотипирование путем секвенирования собранного материала проводили методом GBS с помощью Illumina NovaSeq 6000



RADseq library



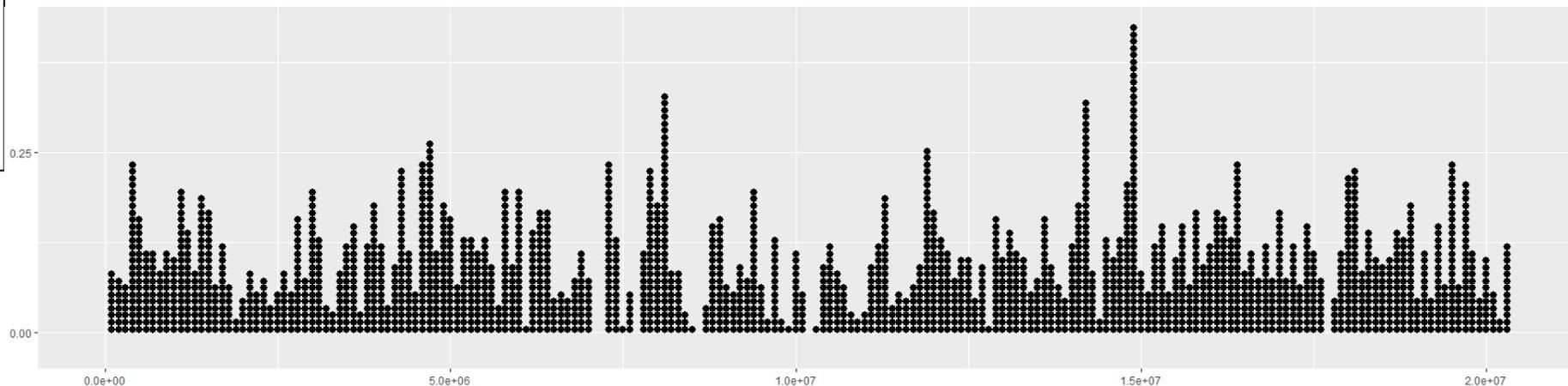
Равномерность покрытие SNPs на примере LG10:

LG10: длина 20,375,199

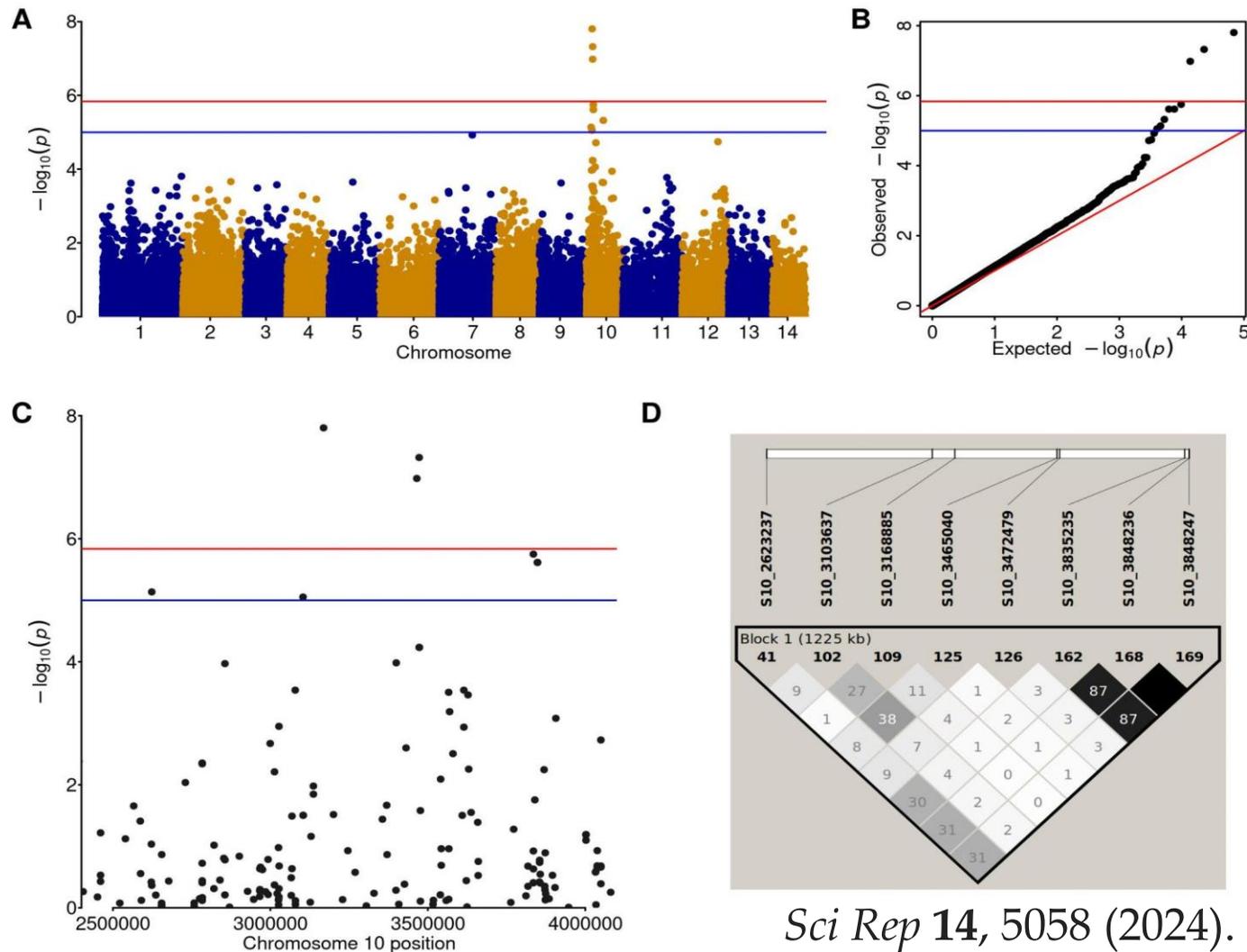
п.о.

~ 20 SNPs на 100,000 п.о.

После проведения фильтрации для дальнейшего анализа популяционной структуры и картирования ассоциаций осталось 37 045 SNPs.



Ассоциативное картирование выявило целевой локус, отвечающий за «карельский фенотип» на 10 хромосоме

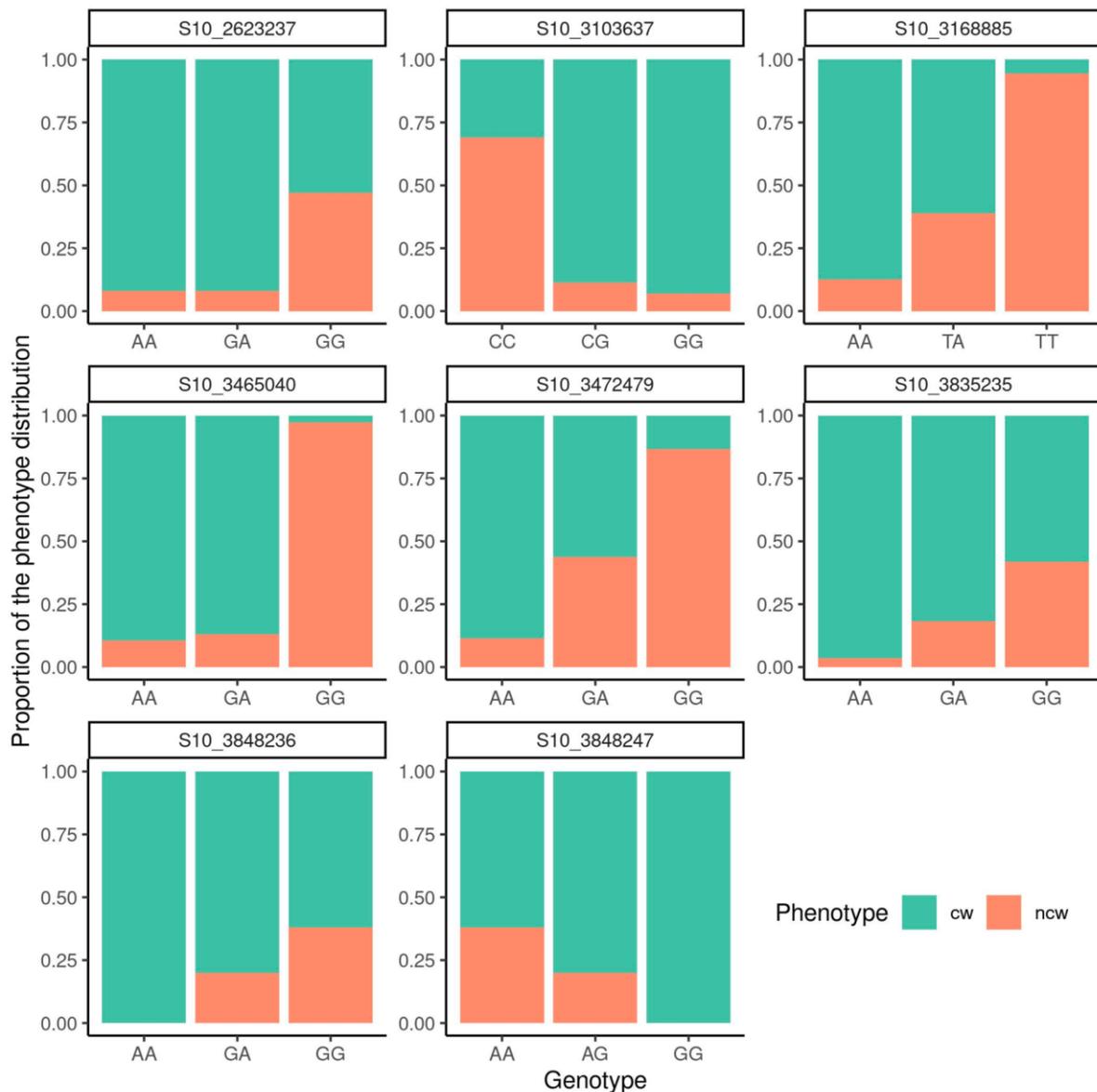


Из 37 045 SNP, прошедших тестирование, 3 SNP оказались значимыми после поправки Бонферрони на множественное тестирование

Используя более мягкий порог FDR ($\alpha = 0,05$). Было выявлено 5 дополнительных SNP

Sci Rep 14, 5058 (2024).

Мутации (SNP), ассоциированные с карельским фенотипом



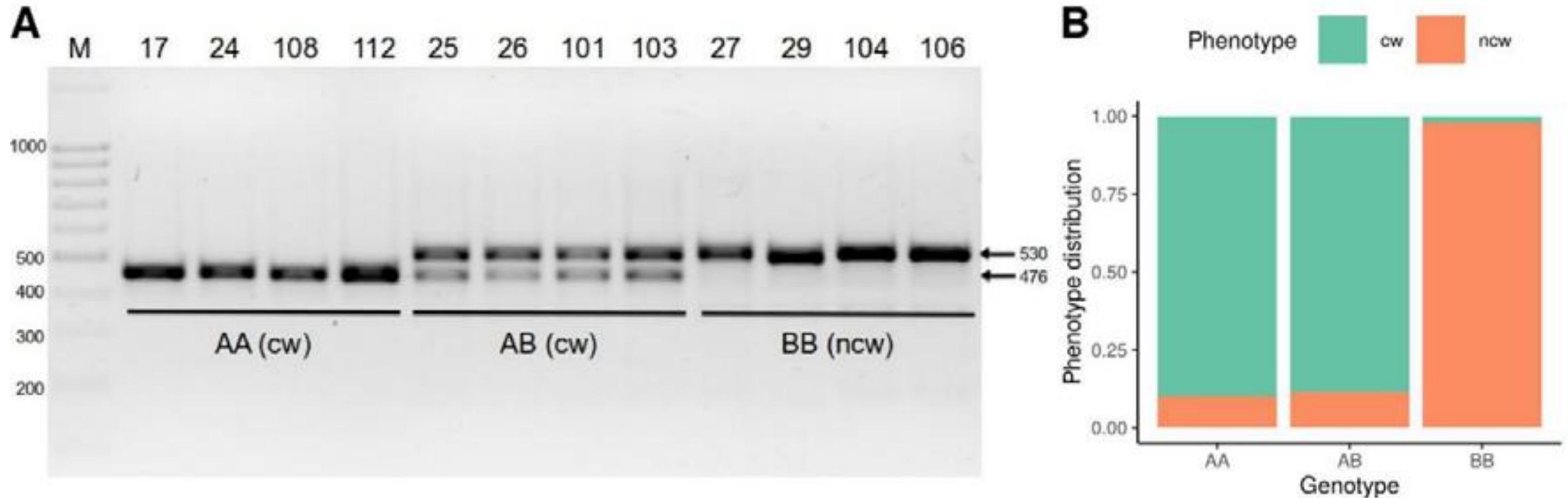
Наиболее значимый SNP (S10_3465040) объясняет до 56% дисперсии.

«Не карельский» фенотип ассоциирован с генотипом «G/G», в то время как генотипы «G/A» или «A/A» указывают на «карельский» фенотип.

 cw  ncw

узорчатый безузорчатый

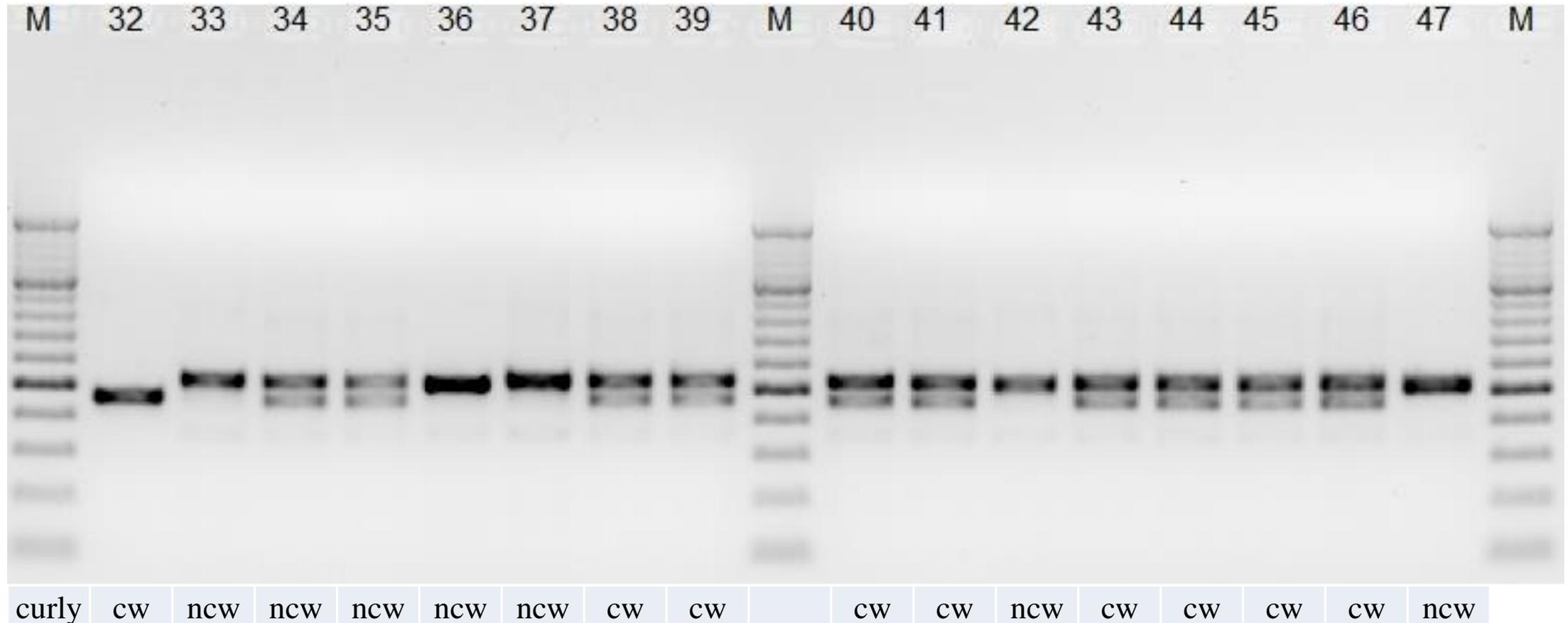
Впервые разработан и запатентован генетический маркер VrCW1, позволяющий предсказать карельский фенотип на любой стадии развития



Делеция 54 п.н. как в гомозиготном (AA), так и в гетерозиготном (AB) состоянии коррелировала с карельским фенотипом в анализируемых популяциях

Sci Rep 14, 5058 (2024).

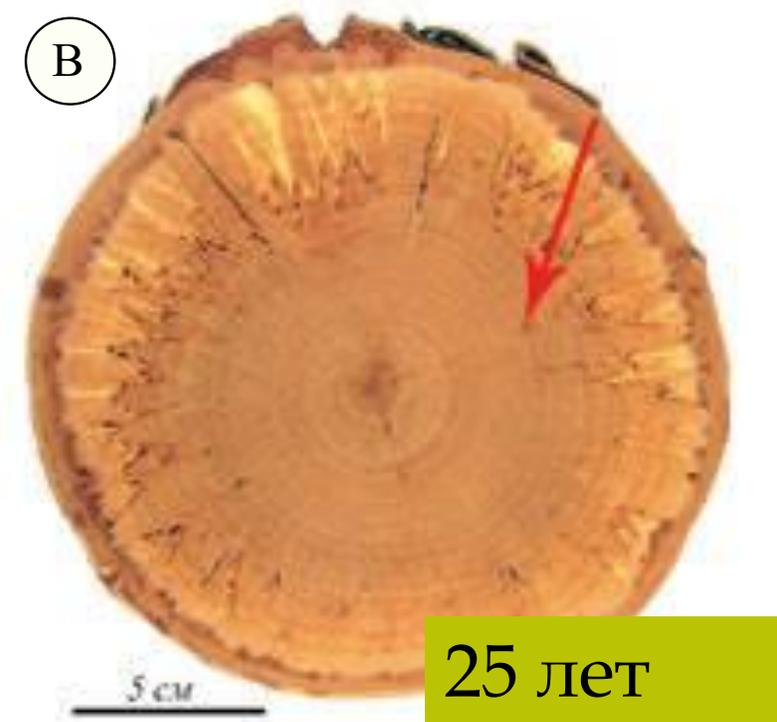
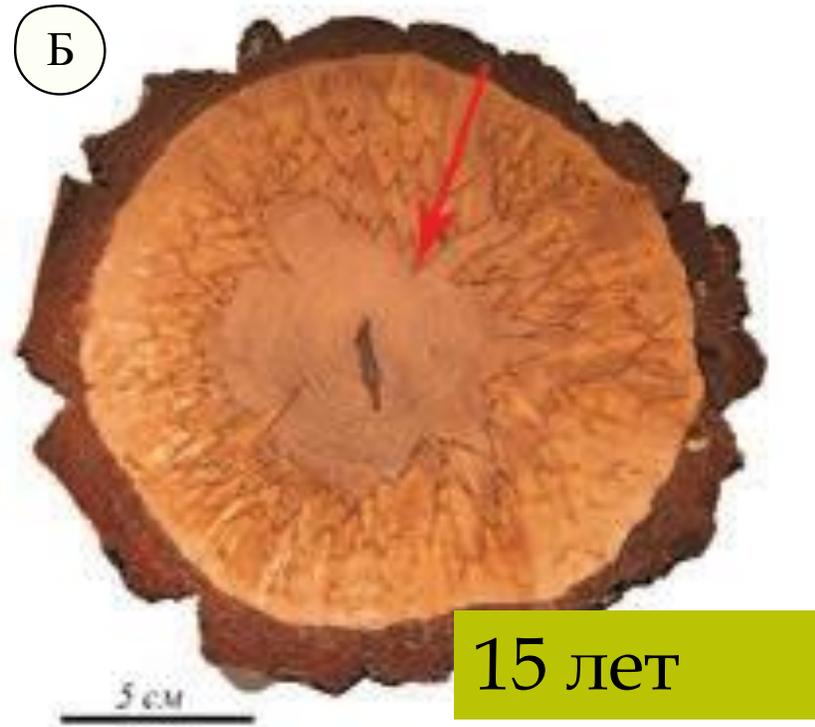
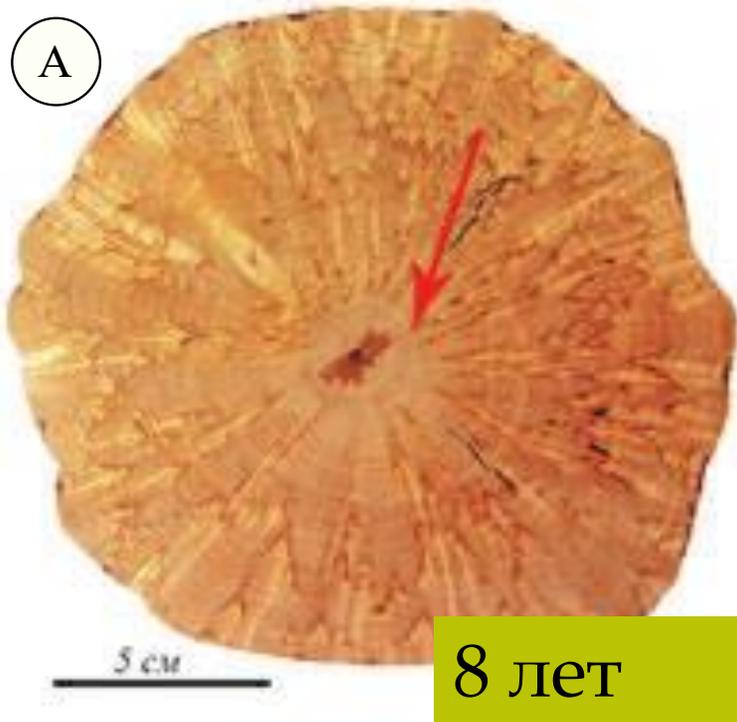
ПЦР маркер ВpCW1 позволяет предсказать «карельский» фенотип у березы в 92% случаев



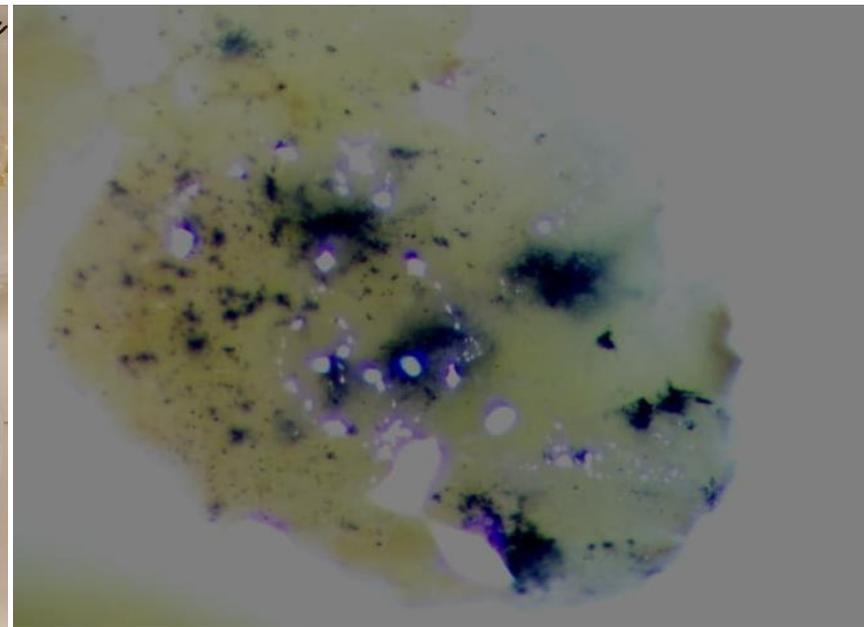
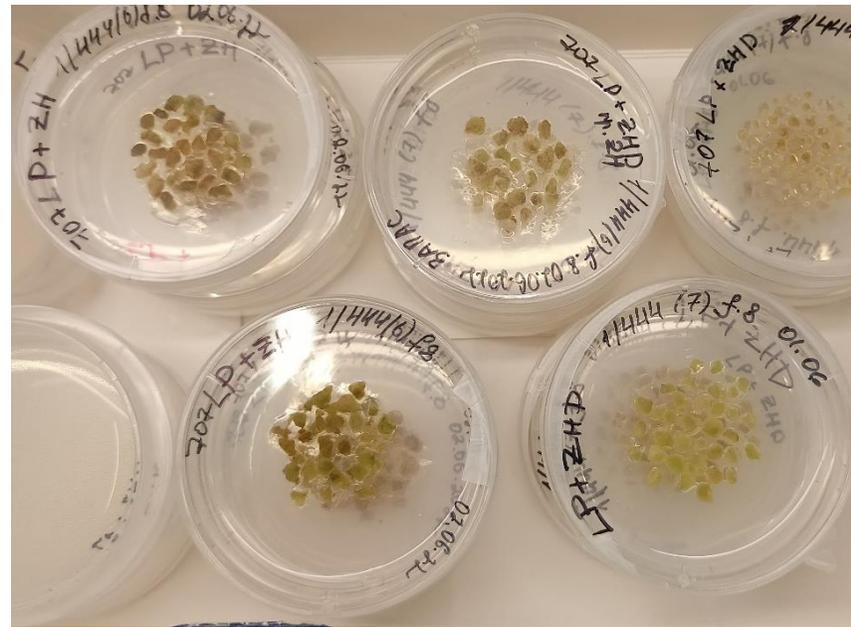
На основе выявленной делеции был разработан и запатентован генетический маркер ВpCW1. Патент на изобретение № 2023122806

Sci Rep 14, 5058 (2024).

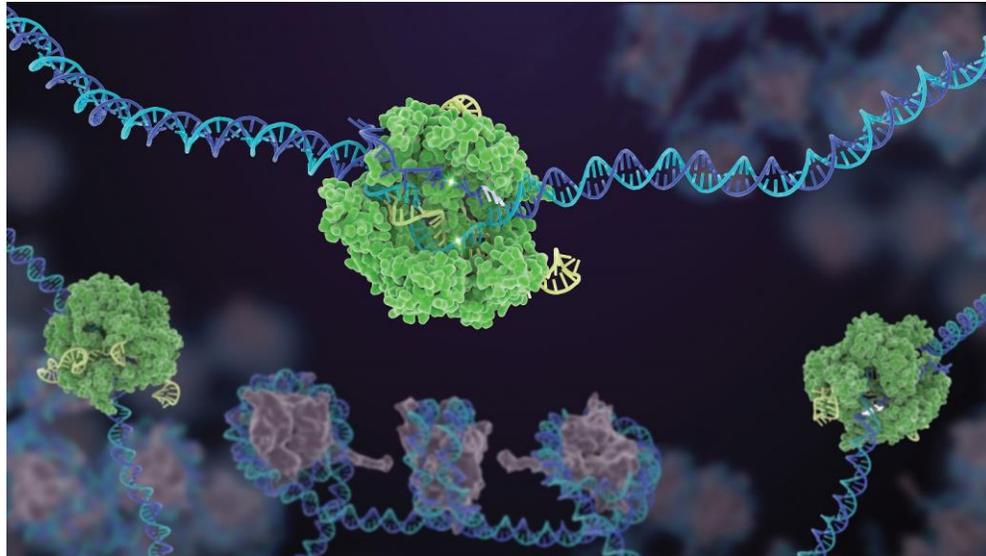
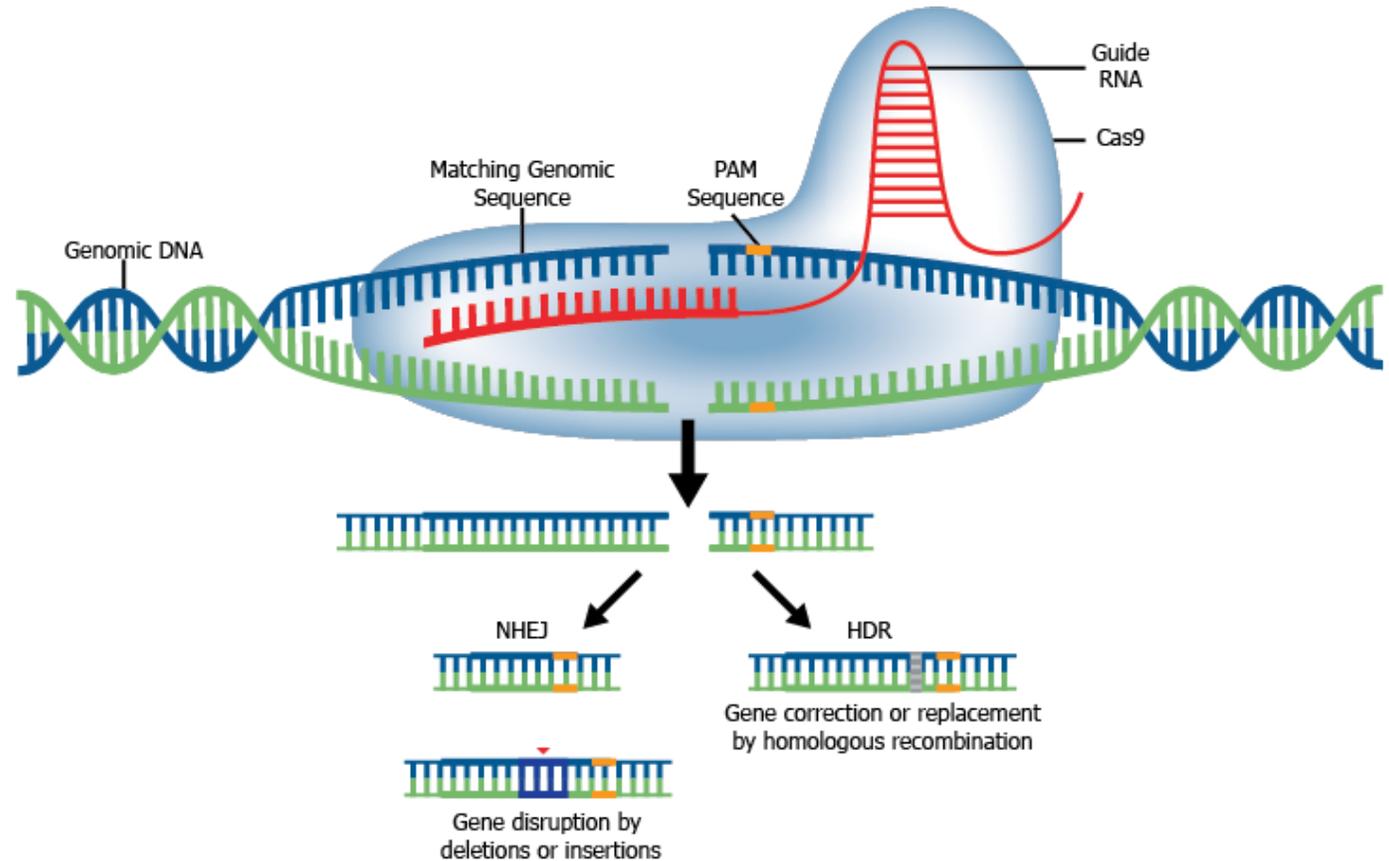
Карельская береза: возраст, когда начинает формироваться узорчатая древесина варьирует от 8 до 25 лет:



Геномное редактирование осины с целью получения стерильных клонов



CRISPR/Cas9 gene editing Jennifer Doudna & Emmanuelle Charpentier Nobel Prize 2020



©2016 Rockland Immunochemicals, Inc.

Современные методы генной инженерии: ГМО и не ГМО (KWS, Germany)

Вариант 1

направленное, случайное изменение небольших участков ДНК (например, точечные мутации или делеции)



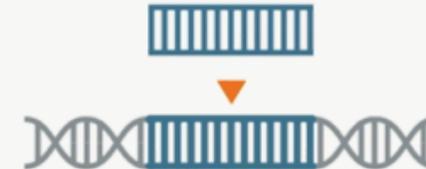
Вариант 2

направленный, ориентированный перенос участков ДНК того же вида



Вариант 3

направленный, ориентированный перенос генов или их участков чужеродного вида



не ГМО

ГМО

Селекция, схожая с естественной природной

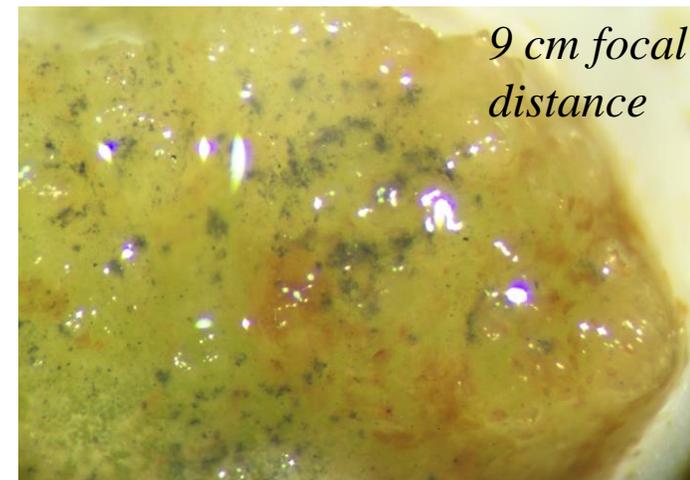
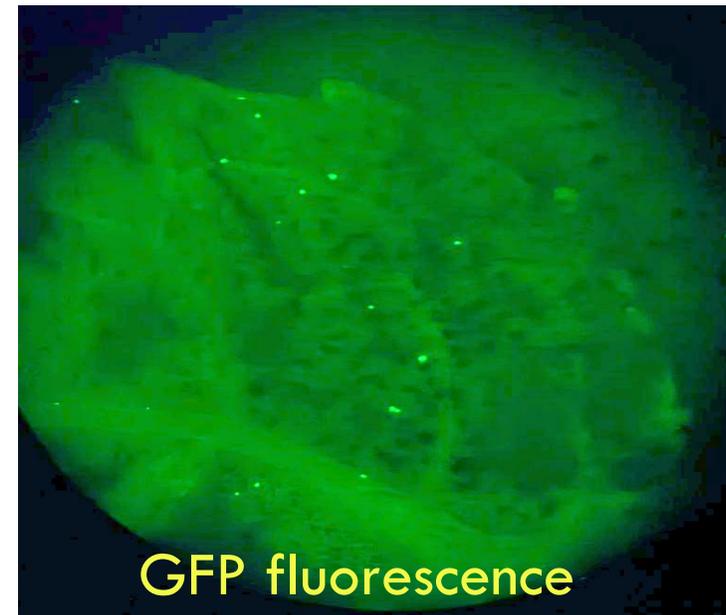
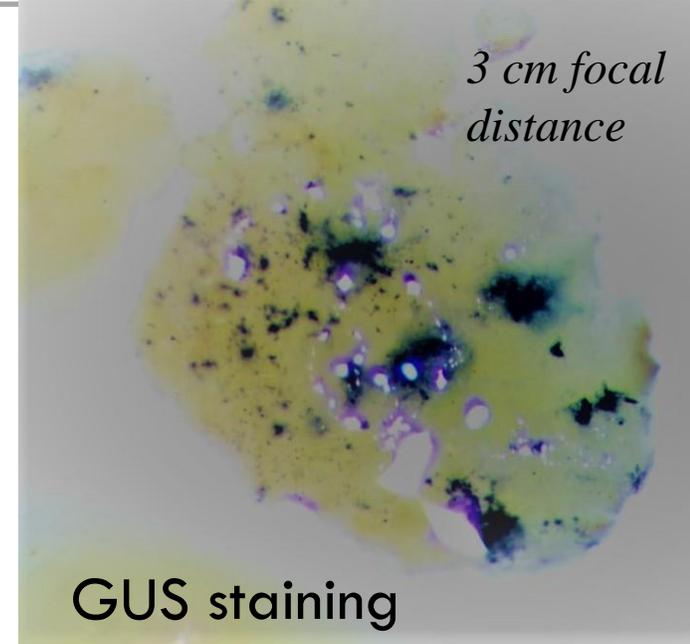
Растения, полученные таким путем, аналогично могут возникать и в природе или классическими методами скрещиваний или комбинационной селекции и таким образом идентичны природным.

Специальное нормативное регулирование не требуется

Генмодифицированные

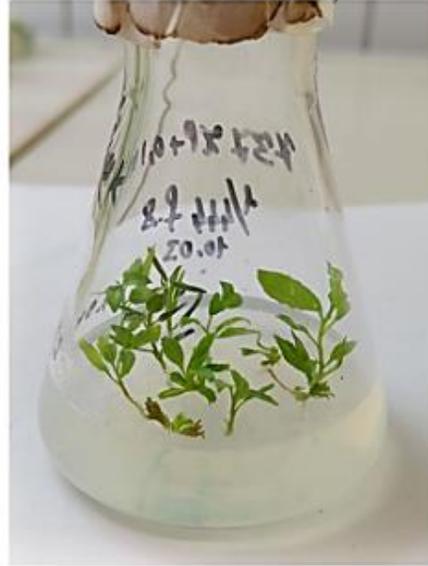
Растения, полученные таким путем, являются генетически модифицированными и **попадают под нормативное регулирование и ГМО-закон ЕС**

Доставка редактирующей конструкции на вольфрамовых частицах в каллусы осины с помощью генной пушки (метод биобаллистики)



От «бомбардированного» каллуса до укорененного саженца осины

КОНФЕРЕНЦИЯ «ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО» доклад Дмитрия Каржаева



НИР по геномному редактированию и молекулярному маркированию
выполняются студентами и выпускниками СПбГЛТУ
на лабораторной базе СПбНИИЛХ

