



ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЗАЩИТЫ ЛЕСА»

**Использование
молекулярно-генетических методов
в практике лесного семеноводства и лесной
фитопатологии**

Отдел генетики и селекции:

Начальник Отдела к.б.н. Шишкина О.К.



ЛЕСНОЕ СЕМЕНОВОДСТВО АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

В лесном фонде России : около 8 тыс. га лесосеменных плантаций основных лесообразующих пород (*Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Picea obovata*, *Pinus sibirica*, *Larix sibirica*, *Larix Sukaczewii*, *Quercus robur*).

Существующие традиционные методы не позволяют сопоставить фактическое размещение рамет клонов на лесосеменных плантациях изначальной схеме их смешения. Необходимо применение инструментальных методов, в частности, анализа ДНК.

На данный момент, без использования генетического анализа, также не представляется возможным обеспечить генетический контроль за используемыми при воспроизводстве лесов партиями лесных семян.

Основные поставленные задачи

- Создать «генетические паспорта» плюсовых деревьев, вегетативное потомство которых представлено на лесосеменных плантациях;
- Протестировать деревья на наиболее крупных лесосеменных плантациях, используемых для заготовки семян и упорядочить схемы смешения рамет;
- Выявить возможные нарушения схем смешения, а также не привитые растения с целью последующей реконструкции лесосеменных плантаций;
- Обеспечить генетический контроль, исключая возможность смешения семян, заготовленных на лесосеменных плантациях с семенами, заготовленными в иных насаждениях.





ЛЕСНАЯ ФИТОПАТОЛОГИЯ АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Внедрение молекулярно-генетических методов в лесную фитопатологию позволяет производить:

- Фитопатологический анализ насаждений на ранних стадиях развития инфекции, а также определять наличие фитопатогенов в почве при подготовке посадочных площадей в качестве экспресс-анализа без выделения патогена в чистую культуру;
- Определение истинных границ распространения инфекции при обнаружении очага поражения;
- Определение источника инфекции (вода, почва и др.) и количества патогенов (определение максимально допустимой концентрации для заражения растений);
- Оценку эффективности карантинных и санитарных мероприятий;
- Определение породного состава на зараженных территориях;
- Выявление устойчивых и толерантных клонов древесных пород;
- Мониторинг появления новых видов патогенов и гибридов.





ПЕРВАЯ ОТРАСЛЕВАЯ ДНК-ЛАБОРАТОРИЯ



Для решения поставленных задач с 2008 года в ФБУ «Российский центр защиты леса» начала работу вновь организованная ДНК – лаборатория. В 2010 открыт филиал лаборатории в Красноярском Центре защиты леса.

Основные направления работы лаборатории

1. Семеноводство:

- Генетическая идентификация клонов на объектах ЕГСК России, паспортизация плюсовых деревьев;
- Определение генетического происхождения семян на основе анализа митохондриальной ДНК.

2. Защита леса

- Фитопатологический мониторинг лесов России на основе анализа ДНК фитопатогенов.

ЛЕСНОЕ СЕМЕНОВОДСТВО ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ОБЪЕКТОВ ЕГСК



Основой для составления генетического паспорта объекта является анализ его ДНК. В настоящее время это один из наиболее быстрых и точных методов, позволяющий определить наследственные свойства объекта. Применение анализа ДНК очень актуально именно в лесном хозяйстве, поскольку позволяет значительно сократить время проведения испытания и оценки семенного и клонового потомства.

Анализ ДНК

Анализ ДНК включает несколько этапов:

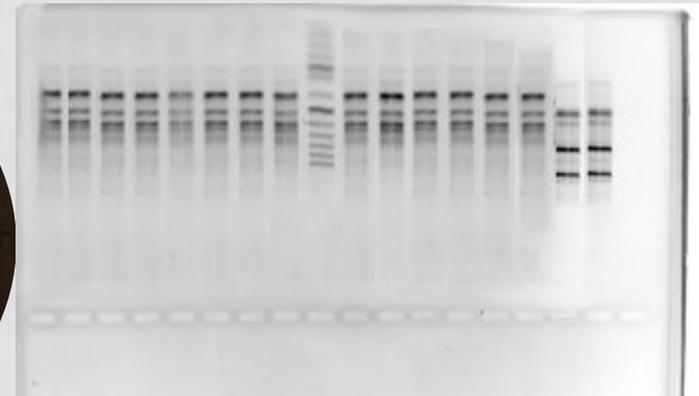
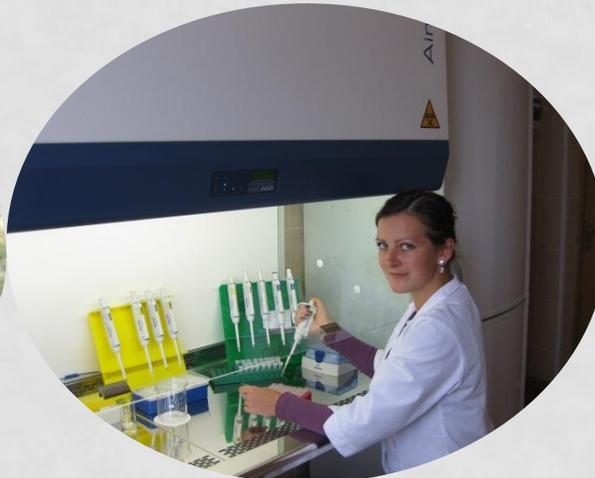
1. Отбор образцов. В качестве объектов исследований могут выступать любые части растения (хвоя, листья, древесина, почки, семена и т.д.)
2. Подготовка образцов (замораживание или высушивание, измельчение и т.д.)
3. Выделение ДНК из образцов.
4. Амплификация – увеличение количества ДНК.
5. Электрофорез.
6. Компьютерная обработка данных анализа с помощью специально разработанных программ



ВИДЫ АНАЛИЗА ДНК

Все виды анализа ДНК можно разделить на 2 большие группы:

- **неспецифический анализ** – анализ ДНК с произвольными праймерами (в реакции используется 1 праймер);
- **специфический анализ** – анализ ДНК со специфическими праймерами на начало и конец определенного гена (в реакции используется 2 праймера);
- **Праймер** - синтезированная часть одноцепочечной ДНК, которая соединяется с ДНК образца, после чего фермент полимеразы достраивает исследуемый участок до конца. Выбор праймеров зависит от цели исследования.



ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В СЕМЕНОВОДСТВЕ

Объекты исследований – хвоя и (или) древесина плюсовых деревьев, растений с архивов клонов (АК) и лесосеменных плантаций (ЛСП) основных лесобразующих пород (сосна, ель, лиственница, сосна сибирская кедровая).

Используемые методы:

- Генетическая идентификация клонов – анализ произвольно амплифицированной полиморфной ДНК по 5 неспецифическим праймерам.
- Составление генетических паспортов плюсовых деревьев и восстановление утраченных схем АК и ЛСП – микросателлитный анализ по 4 парам специфических праймеров.

Генетическая идентификация семян – анализ митохондриальной ДНК.



ОСНОВНЫЕ ИТОГИ РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИИ ЗА 2009-2011 Г.Г. В ОБЛАСТИ СЕМЕНОВОДСТВА

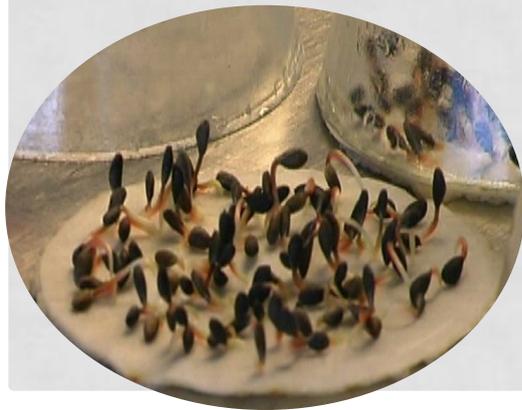
- К настоящему времени сделан генетический анализ и уточнены схемы смешения ЛСП и АК сосны обыкновенной в Московской, Владимирской, Нижегородской и Тверской областях и ели европейской в Московской обл. на площади около 100 га, для чего протестировано более 15 тысяч деревьев и сделано более 75 тысяч анализов ДНК.
- Проводятся работы по составлению генетических паспортов 5814 плюсовых деревьев сосны обыкновенной, числящихся в реестре Московской, Владимирской, Калужской, Рязанской, Тверской, Новгородской, Пермской, Архангельской, Ленинградской, Ульяновской, Нижегородской областей и Республики Коми на основе микросателлитного анализа ДНК. В настоящее время производится подбор праймеров .

The image shows a vertical strip of a document. At the top, there is a header section with text in Russian, including 'Лаборатория генетики и биологии растений' and 'Федеральное государственное учреждение науки Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова'. Below the header is a large table with many columns and rows. Some cells in the table are highlighted in yellow and red. At the bottom of the strip, there is a smaller table with columns labeled '№ п/п', '№ участка', '№ дерева', and '№ анализа'.

ОСНОВНЫЕ ИТОГИ РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИИ ЗА 2009-2011 Г.Г. В ОБЛАСТИ СЕМЕНОВОДСТВА



- **Проводятся работы по идентификации клонов на ЛСП и АК ели европейской и лиственницы в Московской области и сосны сибирской кедровой в Красноярском крае.**
- **Начаты работы по определению генетического происхождения семян методом анализа митохондриальной ДНК, которая наследуется по материнской линии. Отобрано 2700 шишек с участков сосны обыкновенной естественного происхождения разной удаленности от культур посадки 1973-74 г.г. во Владимирской и Московской областях (9 уч.) и ЛСП сосны обыкновенной в Московской области (2 ЛСП) для отработки методики определения происхождения семян по количеству материнских линий в анализируемой партии. В естественных насаждениях материнских линий должно быть от 2-3, на плантациях – более 20.**



**ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ
НАРУШЕНИЕ СХЕМ СМЕШЕНИЯ КЛОНОВ НА ЛЕСОСЕМЕННЫХ ПЛАНТАЦИЯХ (ЛСП) И
АРХИВАХ КЛОНОВ (АК) СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ МОСКОВСКОЙ И ВЛАДИМИРСКОЙ
ОБЛАСТЕЙ**

Московская область, Орехово-Зуевское лесничество,

Куровское участковое лесничество:

ЛСП № 33 (год закладки-1981, 6,0 га, сохранность 52,8%, 566 деревьев, 22 клона) – **42,5%**;

ЛСП № 41 (год закладки – 1984, 1,0 га, сохранность 34,0%, 68 деревьев, 12 клонов) – **51,4%**;

ЛСП № 48 (год закладки-2003, 8,0 га, сохранность 73,9%, 873 дерева, 85 клонов) – **17,3%**;

Абамцевское участковое лесничество:

ЛСП № 47 (год закладки-2000, 10,0га, сохранность 93,5%, 1155 деревьев, 124 клона) – **6,0%**;

Волоколамское лесничество,

Серединское участковое лесничество:

Архив клонов (год закладки-2007, 2,2 га, сохранность 80,9%, 531 дерево, 119 клонов) – **9,8%**;

Владимирская область,

Мошокское участковое лесничество,

Андреевское лесничество:

ЛСП №1 (год закладки – 2007, 11,0 га, сохранность 56,1%,
907 деревьев, 62 клона) – **42,4%**.



ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ НАРУШЕНИЕ СХЕМ СМЕШЕНИЯ В АРХИВЕ КЛОНОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Сокольское лесничество, Унженское участковое лесничество

Архив клонов (год закладки 1976, 2,0 га, сохранность 68,1%,
259 деревьев, 19 клонов) – **17,2%**;

Сокольское лесничество, Шомохтинское участковое лесничество

Архив клонов (год закладки 1987, 3,5 га, сохранность 71,4%, 892 дерева, 37 клонов) – **5,2%**;

Семеновское лесничество, Семеновское участковое лесничество

Архив клонов (год закладки 1980, 1,6 га, сохранность 72,2%, 360 деревьев, 21 клон) – **8,9%**;

Архив клонов (год закладки 1985, 1,5 га, сохранность 77,3%, 297 деревьев, 26 клонов) –
6,45%;

Архив клонов (год закладки 1988, 2,0 га, сохранность 74,3%, 651 дерево, 69 клонов) – **8,5%**;

Архив клонов (год закладки 1994, 0,8 га, сохранность 73,7%, 356 деревьев, 31 клон) – **2,5%**;

Архив клонов (год закладки 1994, 3,1 га, сохранность 50,1%, 720 деревьев, 60 клонов) – **6,4%**;

Архив клонов (год закладки 1999, 4,2 га, 1271 дерево)

Поле 1 (сохранность 66,3%, 882 дерева, 43 клон) - **5,5%**;

Поле 2 (сохранность 56,8%, 389 деревьев, 23 клон) – **15,7%**

Архив клонов (год закладки 2006, 2,0 га, сохранность 92,5%, 909 деревьев, 39 клонов) – **3,4%**



ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ НАРУШЕНИЕ СХЕМ СМЕШЕНИЯ НА ЛСП СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТИ

- ЛСП № 13, Торопецкое лесничество, Торопецкое участковое лесничество, 89 кв., выд.23, 25, 31 (год закладки – 1984, 6,0 га, 1116 дер., сохранность 92,9%, 15 клонов.) – **2,9%**
- ЛСП № 17, Торопецкое лесничество, Торопецкое участковое лесничество, 89 кв., выд.14 (3,0 га, год закладки – 1987, 221 дер., сохранность 36,8%, 25 клонов) – **6,3%**
- ЛСП № 19, Торопецкое лесничество, Торопецкое участковое лесничество, 89 кв., выд.14, (4,5 га, год закладки – 1988, 829 дер., сохранность 92,0%, 25 клонов – **2,9%**

ЛЕСНАЯ ФИТОПАЛОГИЯ

- К настоящему времени совместно с фитопатологами отобрано 48 видов наиболее опасных фитопатогенов.
- В лаборатории начата отработка методики по проведению фитопатологического мониторинга лесов России на основе анализа ДНК по 27 патогенам, для которых подобраны видоспецифические праймеры. Отобраны и подготовлены к выделению 150 образцов с больного, подозрительного и здорового дерева для каждого патогена.
- Отработана методика определения до вида возбудителя бактериального рака-водянки, вызываемого бактериями р. *Erwinia* и р. *Pseudomonas*.
- Отработан метод диагностики зараженности деревьев фитопатогенными грибами р.р. *Inonotus* – *Fellinus* (8 видов).



ЛЕСНАЯ ФИТОПАЛОГИЯ



- В сентябре-октябре 2011 года обследовано более 600 га насаждений в Московской области, пройденных пожарами 2010 г. Отобрано 600 образцов почвы для анализа на наличие генетического материала Ризины волнистой и корневой губки.
- Отработана методика выделения ДНК грибов из почвы и анализа ДНК Ризины волнистой и корневой губки на основе анализа с универсальными и видоспецифическими праймерами.
- Сделан анализ отобранных образцов почвы на наличие генетического материала Р. волнистой и корневой губки.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ РИЗИНЫ ВОЛНИСТОЙ И КОРНЕВОЙ ГУБКИ В ОБРАЗЦАХ ПОЧВЫ С ПЛОЩАДЕЙ, ПРОЙДЕННЫХ ПОЖАРАМИ 2010 ГОДА (НЕЗАВИСИМО ОТ НАЛИЧИЯ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ)

- Ногинское лесничество, Электрогорское участковое лесничество Московской области, кв. 56, 57, 58, общая площадь 230,5 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **53,5%**, корневой губки – **28,5%**.
- Орехово-Зуевское лесничество, Зуевское участковое леснич. Московской области, кв. 23, 24, 25, 26, общая площадь 219, 7 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **38%**, корневой губки – **28 %**.
- Орехово-Зуевское лесничество, Куровское участковое лесничество, Московской области, кв. 31, 32, общая площадь 34,0 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **22%**, корневой губки – **21%**.
- Орехово-Зуевское лесничество, Абрамовское участковое лесничество, Московской области, кв. 4, общая площадь 36,0 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **36%**, корневой губки – **8 %**.
- Орехово-Зуевское лесничество, Куровское участковое лесничество, Московской области, кв. 4, общая площадь 72,2 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **62,0%**, корневой губки – **59,0 %**.
- Виноградовское лесничество, Раменское участковое лесничество Московской области, кв.51, 58, общая площадь 82 га. Частота встречаемости *R. волнистой* – **86,0%**, корневой губки – **19,0 %**.

Для сравнения: генетический анализ почв Питомника Егорьевского лесничества Московской области, территория которого не была пройдена пожаром -ДНК *R. волнистой* обнаружена - **4 %**.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ ПО ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ ПОРАЖЕНИЯ САЖЕНЦЕВ РИЗИНОЙ ВОЛНИСТОЙ НА ГАРЯХ

- **Гриб опасен в мицелиальной форме. Изучен мало. Мер борьбы в настоящее время не разработано.**
- **Рекомендуется проводить рыхление почвы для разрушения мицелия и удаление поврежденных саженцев.**
- **Производить посадки на горях следует через 3-5 лет после пожара по черному пару после обследования почвы на наличие генетического материала Ризины волнистой.**
- **Следует обратить особое внимание на то, что почва – как объект исследования – очень гетерогенна. Мицелий гриба распространен в ней неравномерно. Поэтому появление ДНК Ризины волнистой или других исследуемых грибов даже в нескольких образцах должно явиться побудительным мотивом для проведения профилактических мероприятий. Для этого водится понятие «частота встречаемости».**
- **Опасным можно считать показатель частоты встречаемости выше 5%.**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ПРАКТИКЕ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА



Лесное семеноводство

- 1. Дальнейшая генетическая паспортизация лесосеменных объектов**
- 2. Создание новых лесосеменных объектов под генетическим контролем посадочного материала**
- 3. Определение генетического происхождения партий семян основных лесобразующих пород по анализу их материнской ДНК**



ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ПРАКТИКЕ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

Лесная фитопатология

- **Определение лесных фитопатогенов, отобранных согласно списка , предоставленного фитопатологами ФБУ «Рослесозащита» (48 видов), как по анализу с видоспецифическими праймерами, так и по анализу их рибосомальной ДНК.**
- **Анализ образцов почвы с площадей лесных пожаров, предназначенных для лесовосстановления, на наличие генетического материала Ризины волнистой (*Rhizina undulata*).**
- **Анализ образцов почвы с площадей, предназначенных для создания лесосеменных объектов на наличие генетического материала корневой губки (*Heterobasidion sp.*).**
- **Все работы могут выполняться по заказам при условии сертификации лаборатории и наличия расходных материалов и синтезированных праймеров. Срок определения - 3-5 дней. Стоимость анализа на сегодняшний день 100-200 руб. в зависимости от вида используемой полимеразы и праймеров.**

СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ДНК

Для интенсификации работы лаборатории и выполнения всех анализов на мировом уровне необходимо приобретение нового профессионального оборудования.



1. **Высокую точность анализов и быстрое выделение ДНК из образцов обеспечивает автоматизированная система пробоподготовки типа MagCore HF (16 образцов – 30-45 мин). Стоимость 2- 2,5 млн. руб.**



2. **Для количественного определения наличия генетического материала фитопатогенов в образцах – амплификатор «Real time» (384 образца – 40 мин). Стоимость 3 млн. руб.**



3. **Возможность работы с Мировым генетическим банком для определения вида патогена и его вирулентности, а также проведения микросателлитного анализа в семеноводстве даст приобретение секвенатора (определение последовательности ДНК полученных при анализе фрагментов) типа GS FLX (192 образца - 9 часов, фрагменты 400-800 пар нуклеотидов). Стоимость 3,5 млн. руб.**

**ВЫРАЖАЕМ БЛАГОДАРНОСТЬ СОТРУДНИКАМ
ИНСТИТУТА ЛЕСА
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ЗА ПЛОДОТВОРНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО!**



*КОЛЛЕКТИВ ОТДЕЛА
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ
ФБУ «РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР
ЗАЩИТЫ ЛЕСА»*

**141207
Россия
г.Пушкино
Московской обл.,
ул. Надсоновская,13**

**Телефоны/Факсы:
(495) 993-34-07;
(496) 537-10-55;
(496) 532-40-00;
(496) 532-66-62.**

E-mail: rcfh@aha.ru

Спасибо за внимание