

Резюме проекта, выполняемого

в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

по этапу № 2

Номер Соглашения о предоставлении субсидии: 14.616.21.0013

Тема: «Разработка технологии оценки и прогнозирования экологических эффектов выращивания лесных плантаций на основе биотехнологических форм деревьев с заданными свойствами (увеличенная скорость роста, усиленная ассимиляцией азота почвы, пониженное содержание лигнина, повышенное содержание целлюлозы).»

Приоритетное направление: Рациональное природопользование

Критическая технология: Технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения

Период выполнения: 17.09.2014 - 31.12.2016

Плановое финансирование проекта: 60.00 млн. руб.

Бюджетные средства 26.35 млн. руб.,

Внебюджетные средства 33.65 млн. руб.

Получатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Индустриальный партнер:

Ключевые слова: Лесная биотехнология, математическое моделирование, круговорот азота и углерода, трансгенные растения, рациональное природопользование, прогнозирование экологических эффектов, целлюлоза, лигнин.

1. Цель проекта

Целью проекта является разработка технологии оценки и прогнозирования экологических эффектов лесных плантаций, созданных на основе биотехнологических форм деревьев с заданными признаками (повышенная скорость роста, усиленная ассимиляция азота, пониженное содержание лигнинов, повышенное содержание целлюлозы).

Целью второго этапа является разработка математических моделей оценки и прогнозирования продуктивности древостоя, круговоротов азота и углерода в искусственных лесных экосистемах. Кроме того, предполагается заложить модельный эксперимент в условиях открытого полигона с использованием контейнеризированных растений.

2. Основные результаты проекта

В процессе работ по второму этапу были получены следующие результаты:

1. Проведена работа по адаптации и доращиванию трансгенных растений осины и березы в условиях открытого полигона контейнеризированных культур ФИБХ РАН. Трансгенные линии осины и берёзы после двух месяцев адаптации в теплице были пересажены на доращивание в условиях защищенного грунта. Через неделю растения переносили на открытую площадку. В результате было пересажено растения, принадлежащие к 15 трансгенным и трём контрольным линиям осины и к 9 трансгенным и трем контрольным линиям березы; каждая линия представлена примерно 200-250 растениями.
2. Проведен анализ экспрессии рекомбинантных генов на уровнях транскрипции и трансляции в тканях биотехнологических форм осины и берёзы с разными целевыми признаками. Анализ трансгенных растений осины, содержащих ген *Heg*, подтвердил наличие экспрессии на уровнях транскрипции и трансляции во всех исследуемых линиях. ОТ-ПЦР анализ препаратов тотальной РНК трансгенных линий осины показал наличие положительного сигнала ожидаемого размера у 9 из 10 линий с геном *GS1*, что подтверждает транскрипцию гена глутаминсинтетазы сосны в гетерологичном окружении. Вестерн-блоттинг показал присутствие цитозольной формы глутамин синтетазы в 9 из 10 линий. Установлено также, что уровень экспрессии гена *4CL1* в клонах осины PtXIII4CL2с, PtXIII4CL3а, PtXIII4CL4а ниже, чем в клоне PtXIII4CL1с, что говорит о частичном подавлении экспрессии гена *4CL1* в этих растениях. С помощью ОТ-ПЦР растений березы с геном *GS* подтверждена экспрессия гена *GS1*. Вестерн блоттинг этих растений показал присутствие белка нужного размера во всех 9 трансгенных линиях.
3. Биометрические исследования в условиях открытого полигона контейнеризированных растений позволили выделить

линии трансгенных растений, характеризующихся ускорением роста и повышенной продуктивностью: линии F14 GS 8b, P9 GS 11c, B22 GS 3b и B29 березы с геном GS; линии PtV22 GS (6)8a, f2 GS (6)15a, f2 GS (6)20a осины с геном GS. Показано, что большинство растений трансгенных клонов осины с геном Хег по биомассе превышают контрольные растения. Отмечена также линейная зависимость годового прироста и биомассы растения. Среди линий осины с РНК интерферирующей конструкцией выделены линии с карликовым фенотипом, одна линия превышающая контроль, остальные линии не демонстрировали достоверных от контроля.

4. Заложены долгосрочный модельный эксперимент в условиях открытого полигона на участке шириной 6 м с использованием контейнеризированных растений осины и берёзы. Общее количество растений осины в эксперимента - 650 штук. Общее количество растений березы в эксперимента - 375 штук. Растения были размещены рядами по 50 штук (с разделением в ряду на две группы по 25 штук) в направлении восток-запад. Растения в рядах были расположены рандомизированным образом, без повторного размещения растений одной и той же линии в ряду из 25 растений.

5. Разработана математическая модель оценки и прогнозирования продуктивности древостоя, круговоротов азота и углерода в искусственных лесных экосистемах, созданных с использованием деревьев с заданными характеристиками.

6. Проведено материально-техническое обеспечение работ по молекулярно-биологическому анализу растительных образцов. Закуплены необходимые реактивы для проведения ПЦР анализа и вестерн блоттинга.

7. Проведена работа по патентованию результатов исследований и разработок. Проведена оплата текущих пошлин по заявке на изобретение №2014149794 от 10.12.14 "Трансгенное растение осины с повышенной скоростью роста и увеличенным содержанием целлюлозы в древесине" (авторы изобретения - Видягина Е.О., Шестибратов К.А.). В настоящее время процедура патентования находится на стадии проведения экспертизы по существу. Также повторно подана заявка на изобретение № 2015111078 "Метод использования трансгенных клонов осины и березы с заданными характеристиками в качестве биологических моделей при прогнозировании круговоротов азота и углерода в лесных экосистемах" (авторы: Лебедев В.Г., Видягина Е.О., Ковалицкая Ю.А., Ларионова А.А., Шанин В.Н., Быховец С.С., Комаров А.С., Шестибратов К.А.). Уведомление о положительном результате формальной экспертизы получено 21.04.2015. Проводилась работа по заявке №2013139702 "Способ получения генетически модифицированных растений древесных пород" от 28.08.13 (авторы изобретения: Лебедев В.Г., Шестибратов К.А.), а именно, оплата пошлины, подача ходатайств о внесении дополнений и проведении формальной экспертизы.

8. Иностранным партнёром (Университетом Гёттингена, Германия) проведён транскриптомный анализ образцов с тепличных растений биотехнологических форм осины и берёзы. В ходе исследований производились: получение препаратов суммарной РНК и ДНК из образцов *in vitro* растений березы и осины, получение препаратов кДНК из образцов *in vitro* растений березы и осины, ПЦР-диагностика клональных линий березы и осины на наличие рекомбинантных генов, ПЦР-РВ диагностика клональных линий березы и осины для оценки уровня экспрессии рекомбинантных генов. Установлены уровни экспрессии целевых генов в рекомбинантных клональных линиях березы и осины. Показано, что уровень экспрессии рекомбинантных генов варьирует среди различных клональных линий березы и осины.

На данном этапе была проведена модификация базовых моделей динамики лесных искусственных экосистем и разработаны их специализированные версии EFIMOD-fbr и ROMUL-fbr, позволяющие учитывать специфику роста и корневого питания биотехнологических форм деревьев. А именно, были реализованы следующие задачи:

1. более точное описание конкуренции за элементы почвенного питания;
2. описания рангового распределения приростов биомассы по фракциям дерева;
3. уточнения зависимостей коэффициентов разложения органического вещества от содержания азота в почвенной модели динамики азота и органического вещества;
4. учета в почвенных моделях вклада азотных выпадений (поступления минеральных соединений азота из атмосферы) в формирование пула доступного азота.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного исследования и экспериментальной разработки

На данном этапе не запланированы.

4. Назначение и область применения результатов проекта

Результаты этапа будут использованы на следующих этапах научно-исследовательских работ.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Основным результатом выполненных на данном этапе работ является ряд математических моделей, которые лягут в основу программных продуктов. Эти программы могут быть эффективным инструментарием для оценки и прогнозирования экологических эффектов выращивания лесных плантаций на основе биотехнологических форм деревьев с заданными свойствами (увеличенная скорость роста, усиленная ассимиляцией азота почвы, пониженное содержание лигнина, повышенное содержание целлюлозы).

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Коммерциализация результатов второго этапа проекта не предусмотрена. Одной из форм коммерциализации результатов

проекта является создание специального сервера, предназначенного для размещения файлового репозитория проекта, который будет содержать доступные для загрузки через информационно-телекоммуникационную сеть Интернет локальные версии применяемых в ходе работ по проекту компьютерных моделей.

7. Наличие соисполнителей

Организация-соисполнитель работ по проекту:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук (ИФХиБПП РАН).

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

директор
(должность)

(подпись)

Иванов В.Т.
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту

руководитель группы лесной биотехнологии
(должность)

(подпись)

Шестибратов К.А.
(фамилия, имя, отчество)

М.П.