

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ЛЕСНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 575.113

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

© 2014 г. К. В. Крутовский

Сибирский федеральный университет

Научно-образовательный центр геномных исследований

660036, Красноярск, Академгородок, 50а/2

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3

Геттингенский университет

Германия, 37077, Геттинген, ул. Бюсенвег, 2

Техасский агро-механический университет

США, 77843, Техас, Колледж Стейшин

E-mail: kkrutovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2014 г.

Хвойные являются ключевыми видами бореальных экосистем. Полное секвенирование, сборка и аннотация генома хвойных позволят понять эволюцию этого очень непростого и древнего генома, имеющего гигантский размер, который, например, у лиственниц в 4 раза, а у сосен – в 7–9 раз превышает геном человека. Геномные исследования позволяют получить важную информацию и разработать высокоинформативные молекулярно-генетические маркеры, такие как микросателлиты и однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), которые могут быть эффективно использованы для определения происхождения древесины, изучения и мониторинга генетической изменчивости хвойных лесов, их адаптации к изменению климата и для создания селекционных и природоохранных программ.

Ключевые слова: геном, *de novo* секвенирование, лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.), сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), бореальные леса, фитопатогены, лесное хозяйство.

Благодаря научно-техническому прогрессу в молекулярной биологии, нанотехнологиях и грандиозным достижениям в создании новых высокоэффективных и высокопроизводительных методов массового анализа белков, метаболитов и расшифровки последовательностей ДНК и РНК (так называемые «технологии нового поколения секвенирования» – «next generation sequencing technologies») геномные исследования получили стремительное развитие и буквально революционизировали современную биологию и биомедицину, став одним из основных двигателей их развития за последние 10 лет. Геномные исследования отличает интеграцион-

ный системный подход, при котором изучается изменчивость индивидуальных признаков организмов на уровне всего генома или по большому числу генов и маркеров в совокупности с изучением изменчивости индивидуальных биохимических, физиологических и морфологических признаков, экспрессии генов и особенностей среды обитания (Крутовский, 2006). Это позволило определить у человека гены и аллели, ответственные за наследственные заболевания, предрасположенность к онкозаболеваниям и психическим расстройствам со сложной этиологией, за чувствительность к медицинским препаратам и т. д. У древесных видов геном-

ный анализ позволил обнаружить связи между аллельной генетической изменчивостью и изменчивостью важных адаптивных и селекционно-ценных фенотипических признаков, таких как скорость роста, качество древесины, устойчивость к заболеваниям, замерзанию, засухе и т. д. (Eckert et al., 2009a; González-Martínez et al., 2011; Chhatre et al., 2013). Кроме того, выявление генетических механизмов локальной адаптации популяций очень важно для разработки научно обоснованных лесоохранных, лесосеменных и лесовосстановительных программ, особенно в контексте активного обмена и перемещения растительного материала (assisted migration) для заблаговременного предотвращения неблагоприятных последствий изменения климата (Тараканов и др., 2010; Krutovsky et al., 2012). Популяционный, ассоциативный и сравнительный геномный анализ позволяют вычлнить адаптивную структуру популяций, понять молекулярную эволюцию важных генов и выявить аллели, находящиеся под влиянием различных форм отбора (Krutovsky, Neale 2001, 2005; González-Martínez et al., 2006, 2011; Eckert et al., 2009b; Chhatre et al., 2013; Koralewski et al., 2014).

К последним достижениям в области лесной геномики относятся полногеномное секвенирование, сборка и аннотирование гигантских геномов ели обыкновенной *Picea abies* (Nystedt et al., 2013), ели белой *Picea glauca* (Birol et al., 2013), сосны ладанной *Pinus taeda* (Neale et al., 2014; Wegrzyn et al., 2014; Zimin et al., 2014) и других видов хвойных (см. таблицу), в том числе листвен-

Проекты полногеномного *de novo* секвенирования хвойных

ницы сибирской *Larix sibirica*, сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* и сосны кедровой сибирской *Pinus sibirica* (Krutovsky, 2013; Крутовский и др., 2014).

В 2014 г. стартовал проект «Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации» под руководством автора данной статьи, выигравший мегагрант № 14.Y26.31.0004 от Правительства РФ (news.sfu-kras.ru/node/13196). В рамках этого мегапроекта планируются секвенирование, сборка и аннотирование геномов основных российских лесообразующих пород, лиственницы сибирской, сосны обыкновенной и сосны кедровой сибирской и их наиболее опасных патогенов, в первую очередь грибов, входящих в комплексы *Armillaria mellea s.l.* и *Heterobasidion annosum s.l.*, которые вызывают катастрофическое усыхание российских бореальных лесов. Сравнительный анализ геномов слабо- и сильнопатогенных форм позволит нам лучше понять механизмы этой патогенности и найти способы борьбы с ней или использования на свои нужды, например для быстрого и экологически безопасного разложения древесных отходов и получения субстрата, пригодного для ферментативного получения этанола для производства биотоплива как альтернативного и возобновляемого источника энергии.

Исследования будут осуществлены на базе Научно-образовательного центра геномных исследований, созданного под руководством автора в апреле 2012 г. как структурное под-

Вид	Размер генома		Ведущая организация (руководитель проекта, бюджет, год начала проекта)
	млрд нуклеотидных оснований	в соотношении к геному человека	
Norway spruce (<i>Picea abies</i>)	19.57	6	Umeå Plant Science Centre, Sweden (P. Ingvarsson, \$12M, 2010)
White spruce (<i>Picea glauca</i>)	19.76	6	Université Laval, Canada (J. MacKay, \$10M, 2010)
Loblolly pine (<i>Pinus taeda</i>)	21.61	7	University of California, Davis, USA (D. Neale, \$15M, 2011)
Sugar pine (<i>P. lambertiana</i>)	28.90	9	
Douglas-fir (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	18.63	6	
Maritime pine (<i>P. pinaster</i>)	23.81	7	European Union (M.-T. Cervera, INIA CIFOR, Spain, \$10M, 2012)
Scots pine (<i>P. sylvestris</i>)	22.47	7	
Siberian larch (<i>Larix sibirica</i>)	12.03	4	Siberian Federal University, Russia (K. Krutovsky, \$2M, 2014)
Siberian pine (<i>P. sibirica</i>)	23.62	7	

разделение Сибирского федерального университета (genome.sfu-kras.ru), и организованной в 2014 г. лаборатории лесной геномики. Задача секвенирования генома хвойных очень непростая, что вызвано громадным и не связанным с недавней полиплоидизацией размером генома хвойных, который, например, у сосен в 7–9 раз превышает геном человека (см. таблицу). Причина такого размера до сих пор не разгадана, хотя, предположительно, это связано с избытком высокоповторяющихся последовательностей ДНК, из которых на 80 % состоит геном хвойных.

Данные исследования позволяют получить важную информацию и разработать высокоинформативные молекулярно-генетические маркеры, которые могут быть эффективно использованы для определения происхождения древесины, изучения и мониторинга генетической изменчивости хвойных лесов, их адаптации к изменению климата и для создания селекционных и природоохранных программ. Эти же задачи заявлены как приоритетные для лесного хозяйства в Комплексной программе развития биотехнологий в РФ на период до 2020 г., утвержденной Правительством РФ 24 апреля 2012 г.

Хвойные леса составляют основу бореальных экосистем и имеют не только колоссальное экономическое значение. Они также оказывают огромное локальное и глобальное влияние на экологию и климат, играют ведущую роль в кругообороте углерода. В связи с этим большую озабоченность вызывают проблемы российских бореальных лесов. Среди административно-хозяйственных, юридических, природоохранных и экологических проблем основными являются незаконные рубки леса, недостаточное естественное и искусственное воспроизводство лесов, гибель лесов на больших территориях вследствие воздействия фитопатогенов, различных насекомых-вредителей и заболеваний, усугубляемая усилившимися в последнее время катастрофическими и продолжительными засухами, вызванными, вероятно, глобальным изменением климата. Что касается научно-практических проблем, то среди них нужно выделить недостаточное внедрение в селекцию современных биотехнологических, ге-

нетических и геномных методов. Все это обуславливает важность генетических и геномных исследований хвойных. В последнее время благодаря новым методам секвенирования и генотипирования появилась возможность исследовать популяционные выборки по большому числу генов. Примером могут служить исследования ладанной сосны – основного источника древесины в мире, в которых также участвовал автор. В рамках большого интеграционного межинститутского северо-американского лесного геномного проекта «Conifer Translational Genomics Network» (dendrome.ucdavis.edu/ctgn) прогено-типировано около 5000 генов в более чем 5000 деревьев ладанной сосны, для которых также получены данные по фенотипической изменчивости большого числа адаптивных и селекционно-ценных признаков, а также средовые показатели. Обнаружены важные ассоциации между определенными генотипами и фенотипами, а также с условиями обитания (Chhatre et al., 2013). В настоящее время проводится генотипирование более 35 000 генов в 400 хорошо фенотипически изученных деревьях, полученных совместно с коллегами в рамках другого большого интеграционного проекта «Pine Integrated Network: Education, Mitigation, and Adaptation» (pinemap.org), одной из задач которого является поиск генов, контролирующих изменчивость важных хозяйственных и адаптивных признаков и связанных с адаптацией к средовым факторам, для дальнейшего их использования в геномной селекции для получения генетически улучшенных сортов деревьев, более устойчивых к неблагоприятным факторам среды (Krutovsky et al., 2013; Whetten et al., 2012, 2013).

В заключение необходимо отметить, что одной из ближайших важнейших задач, решению которой геномные исследования могут существенно помочь, является создание популяционно-генетических баз данных изменчивости высокоинформативных молекулярно-генетических маркеров в популяциях основных лесобразующих пород РФ (Крутовский и др., 2014). В свою очередь, для более эффективного использования геномных методов необходимо создание единых и до-

ступных баз данных по изменчивости фенотипических признаков, полученных в многочисленных экспериментах и селекционных программах РФ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-01462а и гранта Правительства РФ «Геномные исследования основных бореальных лесобразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации» (договор № 14.Y26.31.0004), выделенного в рамках конкурсной программы государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крутовский К. В. От популяционной генетики к популяционной геномике лесных древесных видов: интегрированный популяционно-геномный подход // Генетика. 2006. Т. 42. № 10. С. 1304–1318.
- Крутовский К. В., Орешкова Н. В., Путинцева Ю. А., Ибе А. А., Дейч К. О., Шилкина Е. А. Предварительные результаты полногеномного *de novo* секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) // Сиб. лесн. журн. 2014. № 4. С. 79–83.
- Тараканов В. В., Крутовский К. В., Турок Й. Проблема сохранения лесных генетических ресурсов Сибири в условиях глобального изменения климата и усиливающегося антропогенного влияния // Сиб. экол. журн. 2010. Т. 3. № 6. С. 969–974.
- Birol I., Raymond A., Jackman S. D. et al. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data // Bioinformatics. 2013. V. 29. N. 12. P. 1492–1497.
- Chhatre V., Byram T., Neale D. B. et al. Genetic structure and association mapping of adaptive and selective traits in the East Texas loblolly pine (*Pinus taeda* L.) breeding populations // Tree Genetics and Genomes. 2013. V. 9. N. 5. P. 1161–1178.
- Eckert A. J., Bower A. D., Wegrzyn J. L. et al. Association genetics of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, Pinaceae). I. Cold-hardiness related traits // Genetics. 2009a. V. 182. P. 1289–1302.
- Eckert A. J., Wegrzyn J. L., Pande B. et al. Multi-locus patterns of nucleotide diversity and divergence reveal positive selection at candidate genes related to cold-hardiness in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) // Genetics. 2009b. V. 183. P. 289–298.
- González-Martínez S. C., Krutovsky K. V., Neale D. B. Forest tree population genomics and adaptive evolution // New Phytologist. 2006. V. 170. N. 2. P. 227–238.
- González-Martínez S. C., Dillon S., Garnier-Géré P. H. et al. Patterns of nucleotide diversity and association mapping // Genetics, Genomics and Breeding of Conifers / Ed. by C. Plomion, J. Bousquet, C. Kole. Enfield, New Hampshire: CRC Press, Science Publishers, Inc., 2011. Ch. 6. P. 239–275.
- Koralewski T. E., Brooks J. E., Krutovsky K. V. Molecular evolution of drought tolerance and wood strength related candidate genes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // Silvae Genetica. 2014. V. 63. N. 1–2. P. 59–66.
- Krutovsky K. V. The *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* genome projects // The 2013 conifer genome sequencing summit in Björkliden, Lapland, Sweden, June 14–17, 2013. <http://www.upsc.se/about-upsc/other-information/events/4368-the-2013-conifer-genome-sequencing-summit.html>
- Krutovsky K. V., Neale D. B. Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity // Forest Genetic Resources. 2001. V. 29. P. 7–9.
- Krutovsky K. V., Neale D. B. Forest genomics and new molecular genetic approaches to measuring and conserving adaptive genetic diversity in forest trees // Conservation and management of forest genetic resources in Europe / Ed. by Th. Geburek, J. Turok. Zvoilen: Arbora Publishers, 2005. P. 369–390.
- Krutovsky K. V., Burczyk J., Chybicki I. et al. Gene flow, spatial structure, local adaptation and assisted migration in trees // Genomics of tree crops/ Ed. by R. J. Schnell, P. M. Priya-

- darshan. Springer Science, Inc., 2012. Ch. 4. P. 71–116.
- Krutovsky K., Byram T., Whetten R. et al. PINEMAP + PineRefSeq = Future Forests // PINEMAP (Pine Integrated Network: Education, Mitigation, and Adaptation Project) Year 2 Annual Report | March 2012–February 2013 «Mapping the future of southern pine management in a changing world». 2013. P. 26–27. http://www.pinemap.org/reports/annualreports/PINEMAP_Year_2_Annual_Report_FINAL.pdf
- Neale D. B., Wegrzyn J. L., Stevens K. A. et al. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies // *Genome Biology*. 2014. V. 15. N. 3. R59 DOI: 10.1186/gb-2014-15-3-r59
- Nystedt B., Street N. R., Wetterbom A. et al. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution // *Nature*. 2013. V. 497. N. 7451. P. 579–584.
- Wegrzyn J. L., Liechty J. D., Stevens K. A. et al. Unique features of the Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) megagenome revealed through sequence annotation // *Genetics*. 2014. V. 196. N. 3. P. 891–909.
- Whetten R., Krutovsky K., Holliday J. Comparing genotyping technologies for efficiency and cost-effectiveness. PINEMAP Press (the Pine Integrated Network: Education, Mitigation, and Adaptation Project newsletter). 2012. N. 1. P. 6. http://www.pinemap.org/publications/quarterly-newsletter-pinemap-press/Issue_1_Fall_2012.pdf
- Whetten R., Krutovsky K., Holliday J. Comparing genotyping technologies for efficiency and cost-effectiveness // PINEMAP (Pine Integrated Network: Education, Mitigation, and Adaptation Project) Year 2 Annual Report | March 2012–February 2013 «Mapping the future of southern pine management in a changing world». 2013. P. 30–31. http://www.pinemap.org/reports/annualreports/PINEMAP_Year_2_Annual_Report_FINAL.pdf
- Zimin A., Stevens K. A., Crepeau M. W. et al. Sequencing and Assembly of the 22-Gb Loblolly Pine Genome // *Genetics*. 2014. V. 196. N. 3. P. 875–890.

Prospects for Genomic Research in Forestry

K. V. Krutovsky

Siberian Federal University

Genome Research and Education Centre

Akademgorodok, 50a/2, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences

Gubkin str., 3, Moscow, 119333 Russian Federation

University of Göttingen

Büsgenweg, 2, Göttingen, D-37077 Germany

Texas A&M University

HFSB 305, 2138 TAMU, College Station, Texas, 77843 USA

E-mail: kkrutovsky@gmail.com

Conifers are keystone species of boreal forests. Their whole genome sequencing, assembly and annotation will allow us to understand the evolution of the complex ancient giant conifer genomes that are 4 times larger in larch and 7–9 times larger in pines than the human genome. Genomic studies will allow also to obtain important whole genome sequence data and develop highly polymorphic and informative genetic markers, such as microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs) that can be efficiently used in timber origin identification, for genetic variation monitoring, to study local and climate change adaptation and in tree improvement and conservation programs.

Keywords: *genome, de novo sequencing, Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.), Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), boreal forest, phytopathogens, forestry.*