



Инновации в сельском хозяйстве: опыт и новые возможности



РГАУ МСХА им. К.А.Тимирязева, 15 февраля 2017 г.

Чуенко А.М., Супрунова Т.П., Шанина Е.П., Банадысев С.А., Долгов С.В., Макаров В.В, Игнатов А.Н.

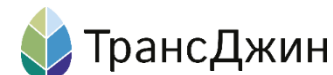
Агропромпарк «Рогачево»: кооперация



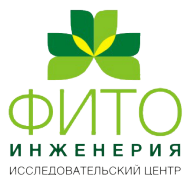
Селекционно-генетический центр «Докаджин».
Развитие и поддержание инфраструктуры.
Организация центра передачи технологий.



Исследования и производство бактериофагов для защиты сельскохозяйственной продукции.



Биотехнологии, разработка с/х культур и продуктов с заданными свойствами.



Инновационные исследования и разработки.
Диагностика вирусных заболеваний и бактериозов с/х культур.
Производство биопрепаратов для борьбы с бактериозами картофеля.
Производство культур с заданными свойствами.



Молекулярно-биологические основы защиты картофеля от пектолитических бактерий (грант РНФ).
Оказание услуг по диагностике возбудителей вирусных и бактериальных заболеваний картофеля на основе новой разработанной технологии изотермической амплификации нуклеиновых кислот (Фонд содействия).
Транспорт генетических конструкций с использованием наночастиц (грант РНФ).
Новые функции клеточного ядра и комплексная устойчивость растений картофеля к болезням и физиологическим стрессам (мега-грант).
Собственные поисковые НИОКР ГК «ДокаДжин».



Биотехнологии, разработка вакцин и фармпрепаратов растительного происхождения.



Международная лаборатория
Резистом

Сервисы точного земледелия.
Стюардшип интегрированной системы защиты картофеля от фитопатогенов.



Производство семенного картофеля.
Производство столового картофеля и овощей.
Долгосрочное хранение продукции.



Сортировка/калибровка/упаковка сырья.
Круглогодичный клиентский сервис.
Дистрибуция продукции в Москве и регионах.



Генная инженерия, биоинформатика.



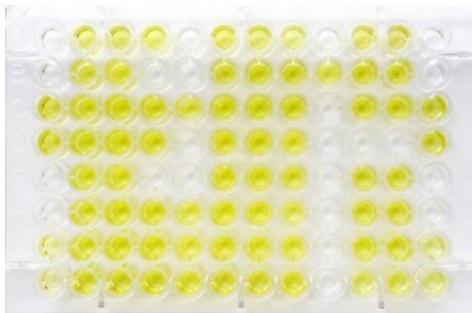
- Кооперация с ведущими селекционными центрами: Cygnet Potato Breeders (Шотландия), Norika (Германия)
 - Собственная коллекция из **19** сортов, **30** гибридов
- Генотипирование собственной коллекции сортов и гибридов картофеля с помощью ДНК-маркеров.
 - Производство до **400 000** миниклубней в год



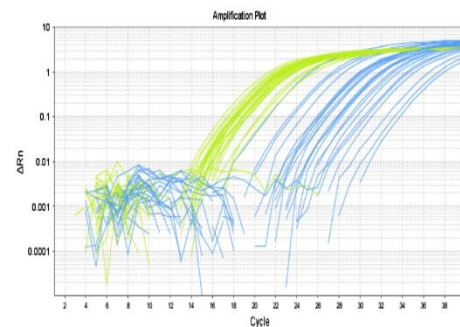
Молекулярная диагностика патогенов картофеля



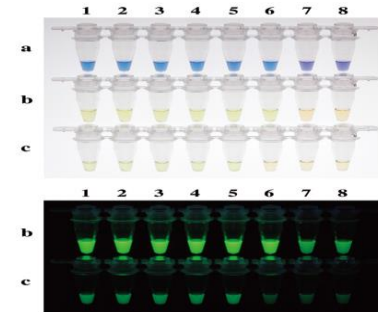
Иммуноферментный анализ
(ИФА / ELISA)



Полимеразная цепная реакция
в режиме реального времени
(ПЦР-РВ / qPCR)



Принцип изотермической петлевой
амплификации ДНК (Loop-mediated
isothermal amplification, LAMP)



Бактериофаги – пожиратели бактерий

Микроорганизмы составляют ~90% биомассы, 1.2×10^{29} клеток

У каждого вида бактерий имеются собственные высоко специфические фаги

Разнообразие фагов $\sim 10^{15}$ видов, количество – до 10^{31}



www.visualphotos.com

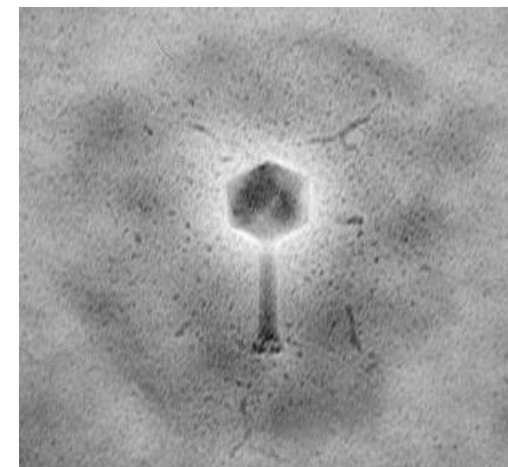
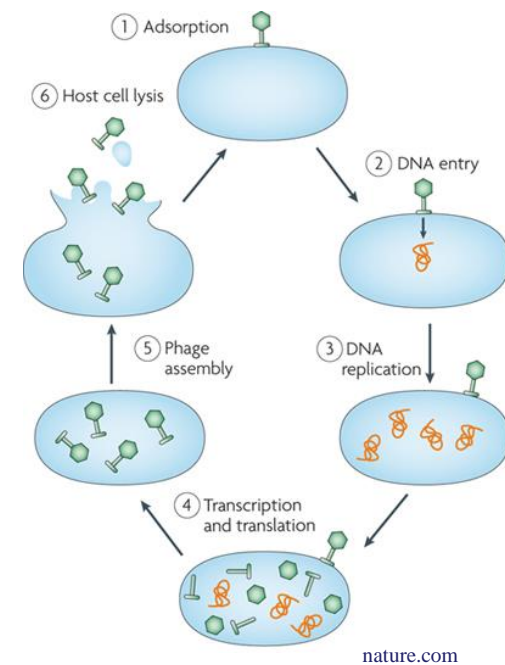


ТУ 9291-001-86668013-14

Сертификат соответствия № РОСС RU.АИ32.Н07045

Собственная коллекция включает **96** штаммов бактерий и **86** фагов и постоянно пополняется

Обработка фагами мытого картофеля осуществляется на производственной линии перед упаковкой продукции и ее поставкой в торговые сети



Бактериофаг PP28 (*D. solani*). Куликов Е.Е. (ИНМИ РАН)

Указ Президента Российской Федерации от 21.07.2016 г., №350 «О мерах по реализации государственной научно-технической политики в интересах развития сельского хозяйства»;

Указ Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации».

Федеральная научно-техническая программа развития сельского хозяйства на 2017-2025 гг..

Национальная Технологическая Инициатива: Платформа FoodNet (2017 – 2035 гг..)

«БИОФАБРИКА»: СОДЕРЖАНИЕ ПРОЕКТА

ПРОДУКТЫ

ПРОИЗВОДСТВО, ДИСТРИБЬЮЦИЯ

Новые сорта картофеля, отвечающие требованиям рынка

Биологические средства защиты растений

СЕРВИСЫ АГРОСТЮАРДШИП

Поддержка принятия решений при выборе сортов, конфигурировании КСЗР, оптимизации агротехники и применения удобрений

Лабораторная диагностика

Карты распространения фитопатогенов, резистентности к СЗР

Информподдержка участников рынка

R&D

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение наночастиц для создания новой технологии редактирования генома картофеля

Роль ядерных генов в создании множественной устойчивости картофеля к вирусным, бактериальным и оомицетным патогенам

ПРИКЛАДНЫЕ НИОКР

СЕЛЕКЦИЯ СОРТОВ И ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ

Технология производства безвирусных растений картофеля на основе моделирования распространения вирусной инфекции

Разработка метода дистанционной диагностики зараженности растений картофеля фитопатогенами для оздоровления посадочного материала в тепличных и полевых условиях

Технология получения исходных растений картофеля, обладающих устойчивостью к вирусу Y, с использованием индуцированного рекомбиногенеза и геномного редактирования

Технология получения исходных растений картофеля с использованием индуцированного рекомбиногенеза и геномного редактирования для снижения редуцирующих сахаров

БИОТЕХНОЛОГИИ

Исследование резистентности патогенов картофеля и овощных культур закрытого грунта к химическим СЗР

Исследование механизмов распространения химических средств защиты в транспортной системе растений картофеля и разработка методов оптимизации применения СЗР

Разработка биопрепаратов на основе бактериальных антагонистов и бактериофагов для защиты картофеля и овощных культур закрытого грунта

ИНФРАСТРУКТУРА

ФАЗА BROWN-FIELD

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ

Сформирована: Современная база хранения семян картофеля и культур в севообороте мощностью 45 тыс. тонн, парк с/х машин и технологического оборудования для производства и подготовки семян.

План:

Ввод дополнительных мощностей по хранению и подготовке оригинальных семян

ИНЖЕНЕРНАЯ

Обеспечены: Водоснабжение, канализация, электрические мощности 4,2 МВт, газификация - первой очереди Индустриального Парка (агропромпарка) "Рогачево".

План:

Вторая очередь инженерной инфраструктуры Индустриального Парка (агропромпарка) «Рогачево»

НАУЧНАЯ

Создан: Биотехнологический комплекс мощностью до 400 тыс. шт. минилабней в год. Селекционно-генетический центр. Аккредитованная диагностическая лаборатория.

План:

Создание на базе Индустриального Парка (агропромпарка) "Рогачево" отраслевой лаборатории ИБХ РАН молекулярно-биологических исследований фитопатогенов картофеля для организации и поддержания интегрированного банка патогенов картофеля, бактериальных антагонистов и специфических бактериофагов.

План:

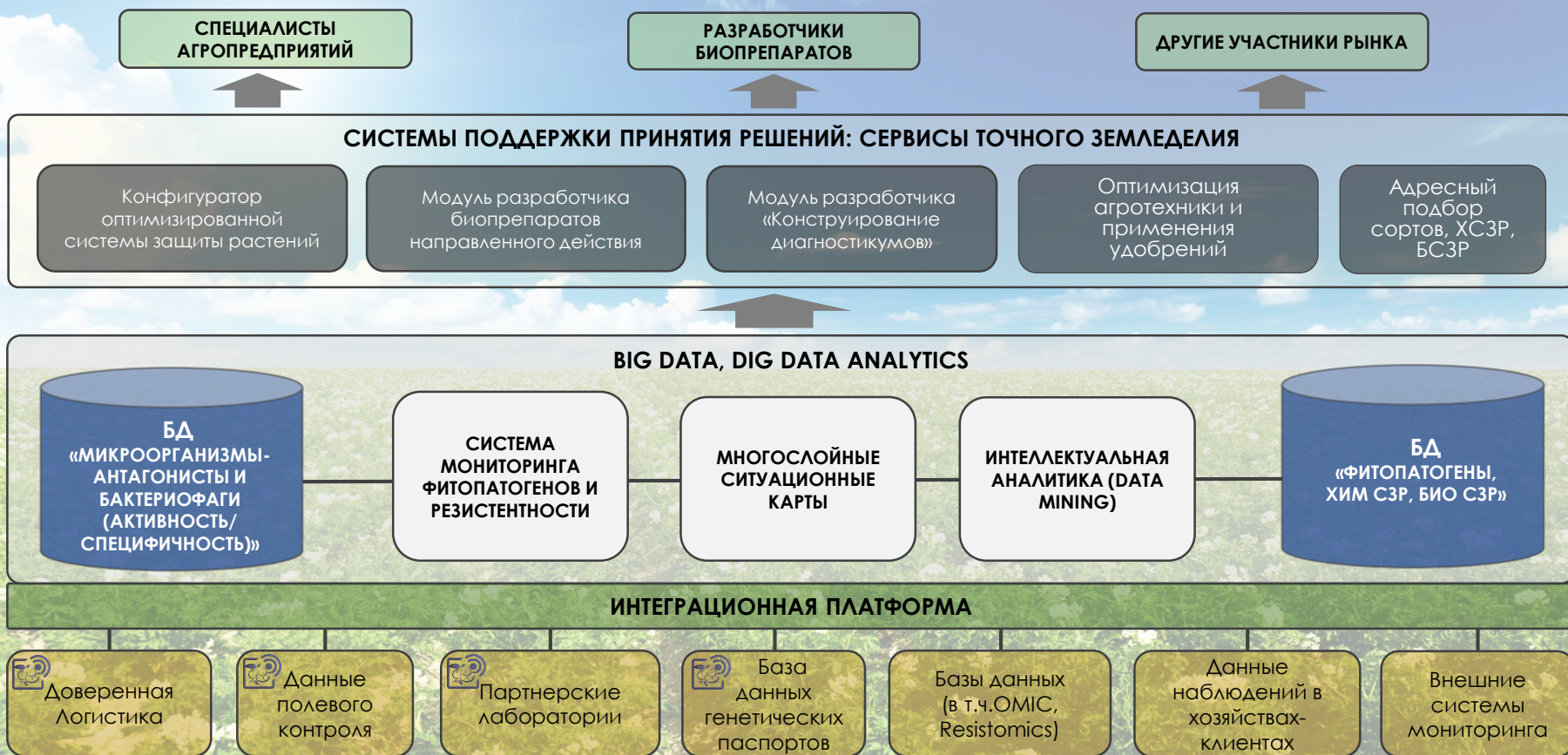
Создание научно-учебного биотехнологического комплекса с искусственным климатом для круглогодичного тестирования новых сортов картофеля, диагностикумов и биопрепаратов для защиты растений картофеля и овощей закрытого грунта.

«БИОФАБРИКА»:

План вывода на рынок оригинальных семян столовых сортов

Селекция	Сорта (линии)	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	
Norika, Германия	Гала, Вега	продажи									
Cugnet PB, Шотландия	Айл оф Джура	продажи									
	Лайонхарт, Ла Страда, Гэтсби, Кингсмен	размножение	размножение	размножение	размножение	продажи					
			гос.испытания	гос.испытания							
		редактирование	редактирование	редактирование	размножение	размножение	продажи				
Собственная селекция СГЦ "ДокаДжин"	Прайм, Индиго, Кармен	размножение	размножение	размножение	размножение	продажи					
			гос.испытания	гос.испытания							
		редактирование	редактирование	редактирование	размножение	размножение	продажи				
	Докер, Калинка	питомник	размножение	размножение	размножение	размножение	продажи				
				гос.испытания	гос.испытания						
		редактирование	редактирование	редактирование	размножение	размножение	продажи				
	Геркулес, ДГТ 36_42	питомник	питомник	размножение	размножение	размножение	продажи				
					гос.испытания	гос.испытания					
			редактирование	редактирование	редактирование	размножение	размножение	продажи			
	ДГТ 33_21, ДГТ 8_61, ДГТ 40_35	питомник	питомник	питомник	размножение	размножение	размножение	продажи			
					гос.испытания	гос.испытания	гос.испытания				
				редактирование	редактирование	редактирование	размножение	размножение	размножение	продажи	

«БИОФАБРИКА»: СЕРВИСЫ ТОЧНОГО ЗЕМЛЕДЕЛИЯ «АГРОСТЮАРДШИП»



Основные направления научно-технологической деятельности Селекционно-Генетического Центра «ДокаДжин»:

- Создание новых сортов картофеля:
 - маркер-вспомогательная селекция - marker assisted selection (MAS);
 - генотипирование сортов картофеля с помощью ДНК-маркеров (микросателлиты);
 - разработка и использование новых генно-инженерных подходов для создания сортов картофеля с заданными свойствами.
 - Получение безвирусного семенного материала (культура апикальных меристем, хемотерапия, термотерапия).
 - Клональное микроразмножение растений картофеля и производство миниклубней.
-

**Сорта картофеля с высоким содержанием антиоксидантов,
имеющие устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам**



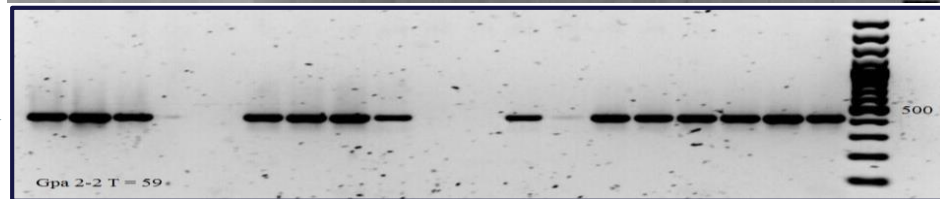
Морфологическое разнообразие видов (описано более 300 видов, в селекции используется 28, наиболее используемые - 7)



Маркер устойчивости к вирусу PVY



Маркер устойчивости к нематоду

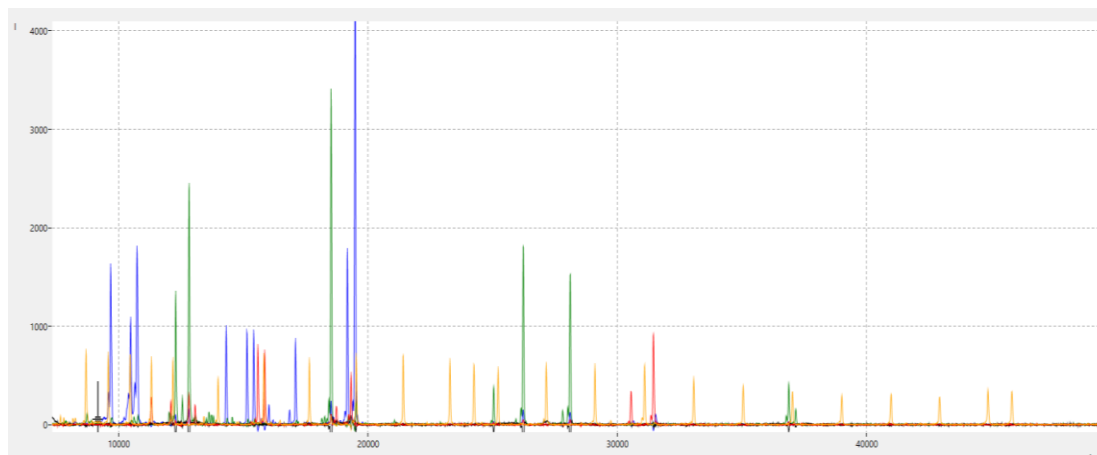


Скрининг образцов на гены устойчивости к биотическим факторам

Генетический паспорт сорта Прайм

STI	STG	STI	STI	STM	STM	STI	STI	STI	STM
0032FAM	0016FAM	001FAM	004R6G	1104R6G	5127R6G	0030ROX	0033ROX	0014ROX	5114ROX
72-81-84 (1-1-2)	123-132-135-153 (1-1-1-1)	175-178 (1-3)	100-106 (1-3)	170 (4)	251-269 (2-2)	88-97-106-109 (1-1-1-1)	138-141 (2-2)	172-178 (1-3)	295-304 (1-3)

Генотипирование сортов картофеля с помощью микросателлитного анализа

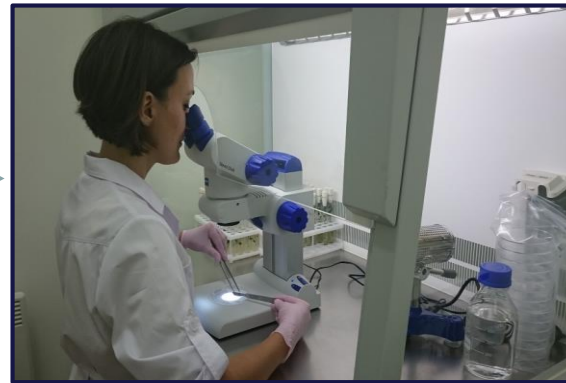




Вирус-инфицированные клубни



Термотерапия 35°C



Выделение апикальных меристем



Хемотерапия: регенерация растений на средах с ингибиторами вирусов



Хемотерапия: регенерация растений на средах с ингибиторами вирусов



Клональное размножение



Получение миниклубней



Миниклубни на гидропонных установках

Семена в поле



Российский
научный фонд

«Применение наночастиц для создания новой технологии редактирования генома картофеля» – грант Российского научного фонда.



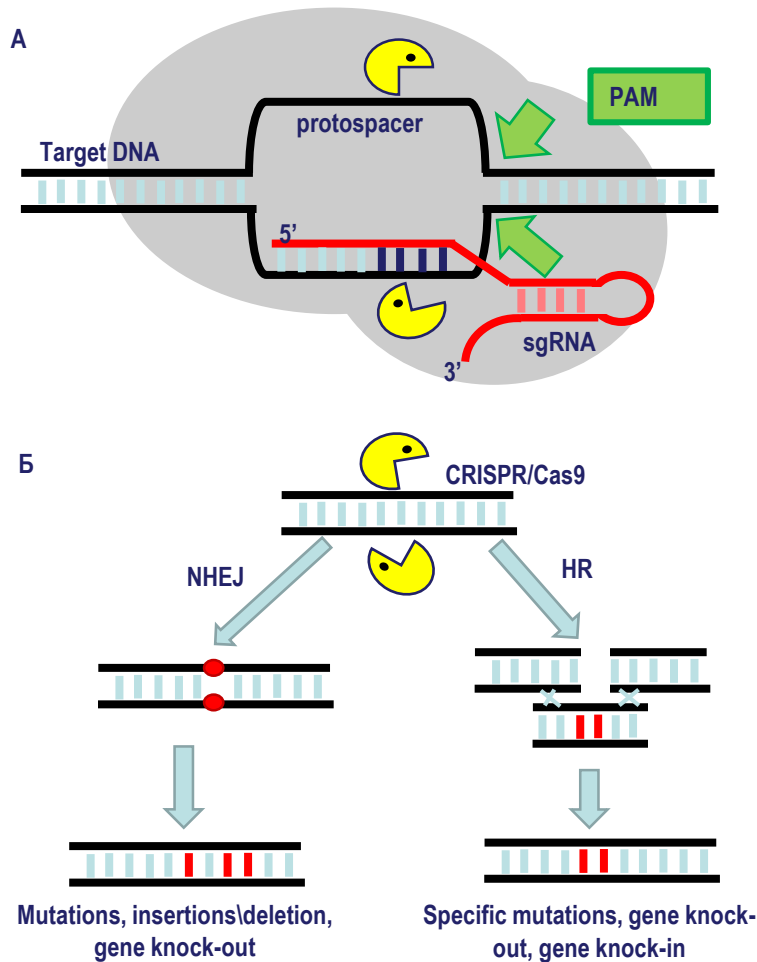
МЕГА-ГРАНТЫ

«Новые функции клеточного ядра и комплексная устойчивость растений картофеля к болезням и физиологическим стрессам» - мега-грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых .

Применение наночастиц для создания новой технологии редактирования генома картофеля

Основные цели проекта:

- разработка новой DNA-free технологии редактирования генома картофеля на основе системы CRISPR/Cas9;
 - получение с помощью новой технологии отредактированных растений картофеля, устойчивых к Y-вирусу картофеля и продуцирующих пониженное количество редуцирующих сахаров
-



Редактирование генома с участием системы CRISPR/Cas9:

А - Направляемое малой гидовой РНК разрезание ДНК с помощью эндонуклеазы Cas9.

Б - Два механизма репарации ДНК: (I) по механизму негомولوجичного соединения концов (II) по механизму гомологичной рекомбинации.

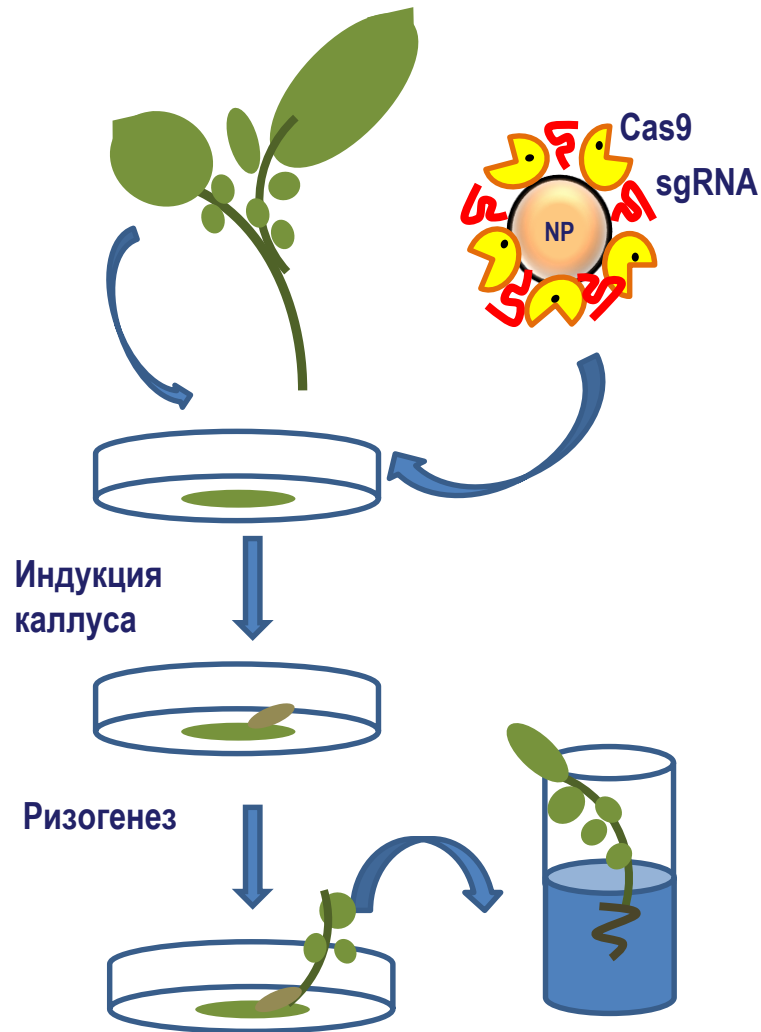


Схема геномного редактирования растений картофеля с помощью новой технологии на основе наночастиц (НЧ) для прямой доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 :

-Дизайн гидовых РНК, in vitro анализ их активности, получение комплексов Cas9/sgRNA

-Функционализация РНП-комплексов на поверхности NP

-Доставка наноплатформ в ткани растений

-Определение эффективности геномного редактирования

-Регенерация растения из обработанного растительного материала

ARTICLE

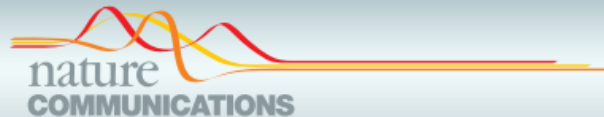
Received 29 Aug 2016 | Accepted 16 Sep 2016 | Published 16 Nov 2016

DOI: 10.1038/ncomms13274

OPEN

Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes

Sergei Svitashov¹, Ch...



ARTICLE

Received 6 Oct 2016 | Accepted 12 Dec 2016 | Published 18 Jan 2017

DOI: 10.1038/ncomms14261

OPEN

Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes

Zhen Liang^{1,2,*}, Kunl
Huawei Zhang¹, Cui



ARTICLES

PUBLISHED: 9 JANUARY 2017 | VOLUME: 3 | ARTICLE NUMBER: 16207

Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses

Neena Mitter^{1*}, Elizabeth A. Worrall¹, Karl E. Robinson¹, Peng Li², Ritesh G. Jain¹, Christelle Taochy^{1,3}, Stephen J. Fletcher^{1,3}, Bernard J. Carroll³, G. Q. (Max) Lu^{2,4} and Zhi Ping Xu^{2*}

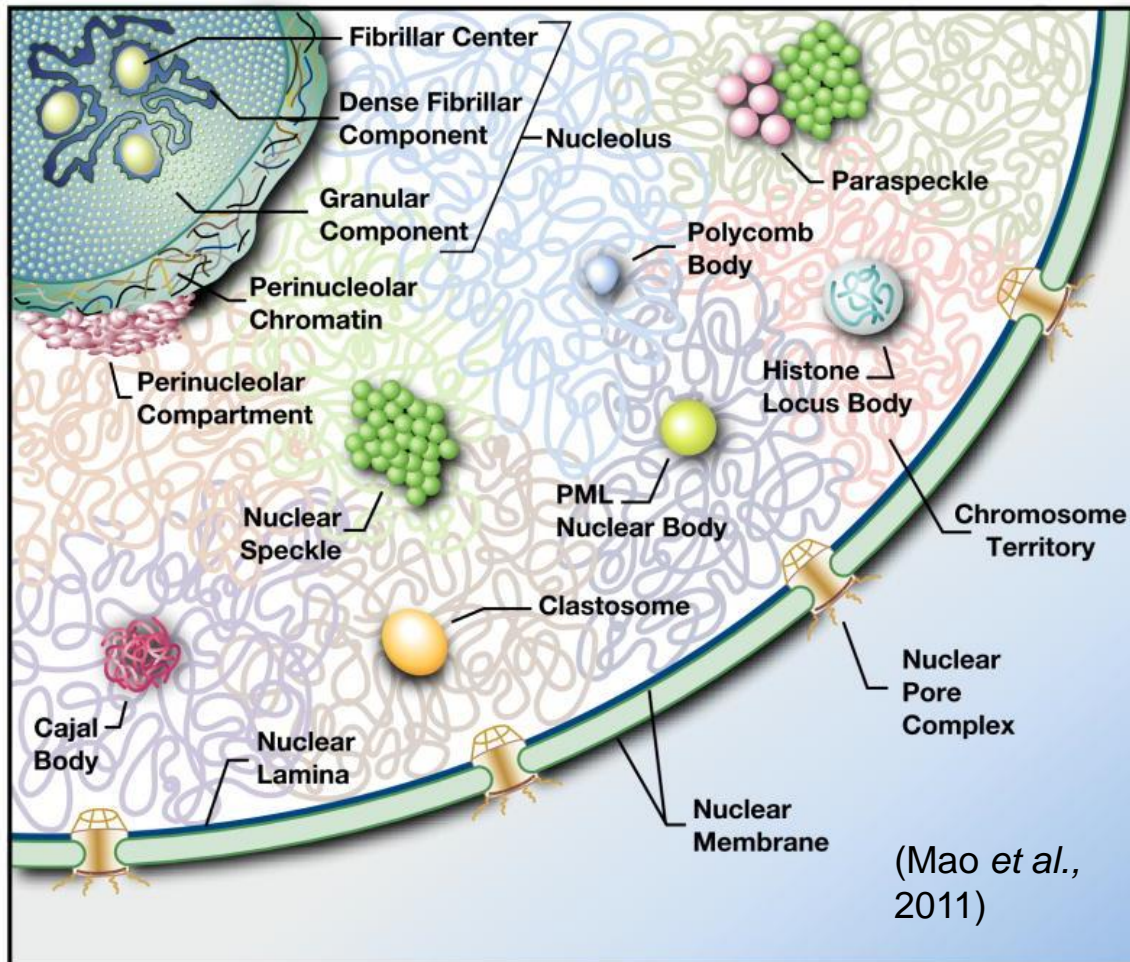
Новые функции клеточного ядра и комплексная устойчивость растений картофеля к болезням и физиологическим стрессам

Основная цель проекта:

Поиск новых механизмов комплексной (неспецифической) устойчивости растений картофеля к стрессам биотическим (бактерии, вирусы) и абиотическим (температура, засуха), связанных с ядром клетки.

Разработка на основе этих механизмов новых подходов для создания новых сортов картофеля устойчивых к широкому спектру стрессовых факторов.

Строение растительного ядра



- эу- и гетерохроматин
- ядрышко
- тельца Кахала
- включения
- фототельца
- НУЛ-1 тельца
- циклофилин содержащие тельца
- АКIP-1 содержащие тельца

Поиск новых функций клеточного ядра, связанных с устойчивостью растений картофеля к болезням и физиологическим стрессам

Поиск новых ядерных белков-кандидатов

Поиск контрастных сортов картофеля

Количественная масс-спектрометрия

Транскриптомный анализ

Изучение внутриклеточных каскадов, интерактомика

Изучение функций выявленных белков методом VIGS

Изучение факторов, блокирующих взаимодействия в ядре

Первичный скрининг потенциальных веществ-кандидатов

Эксперименты по оздоровлению растений с отобранными веществами

Детальное изучение частично известных механизмов, связанных с ответом на стрессы в клеточном ядре

Получение трансгенных растений, оверэкспрессирующих отобранные ядерные белки

Получение трансгенных растений с нокадауном ряда ядерных белков

Изучение особенностей протекания различных физиологических стрессов на трансгенных растениях

Возбудители бактериозов картофеля:

С начала 20-го века в РФ распространяется опасный патоген картофеля *Clavibacter michiganensis* sbsp. *sepedonicus* (в 2016 установлено, что он поражает и томат). Не менее 30% партий семян были заражены им, и в 2015 г. он включен в список регулируемых организмов АЗ.

В 2004 г. в РФ обнаружен новый патоген – картофельная раса *Clavibacter michiganensis* sbsp. *michiganensis* (типичный патоген томата).

В 2009 г. - новые для РФ патогены картофеля *Dickeya dianthicola* и *D. solani*. (Карлов и др. 2010, 2011). Идентичны типовым штаммам тех же видов по полногеномным последовательностям. К 2013 г. отмечаются повсеместно.

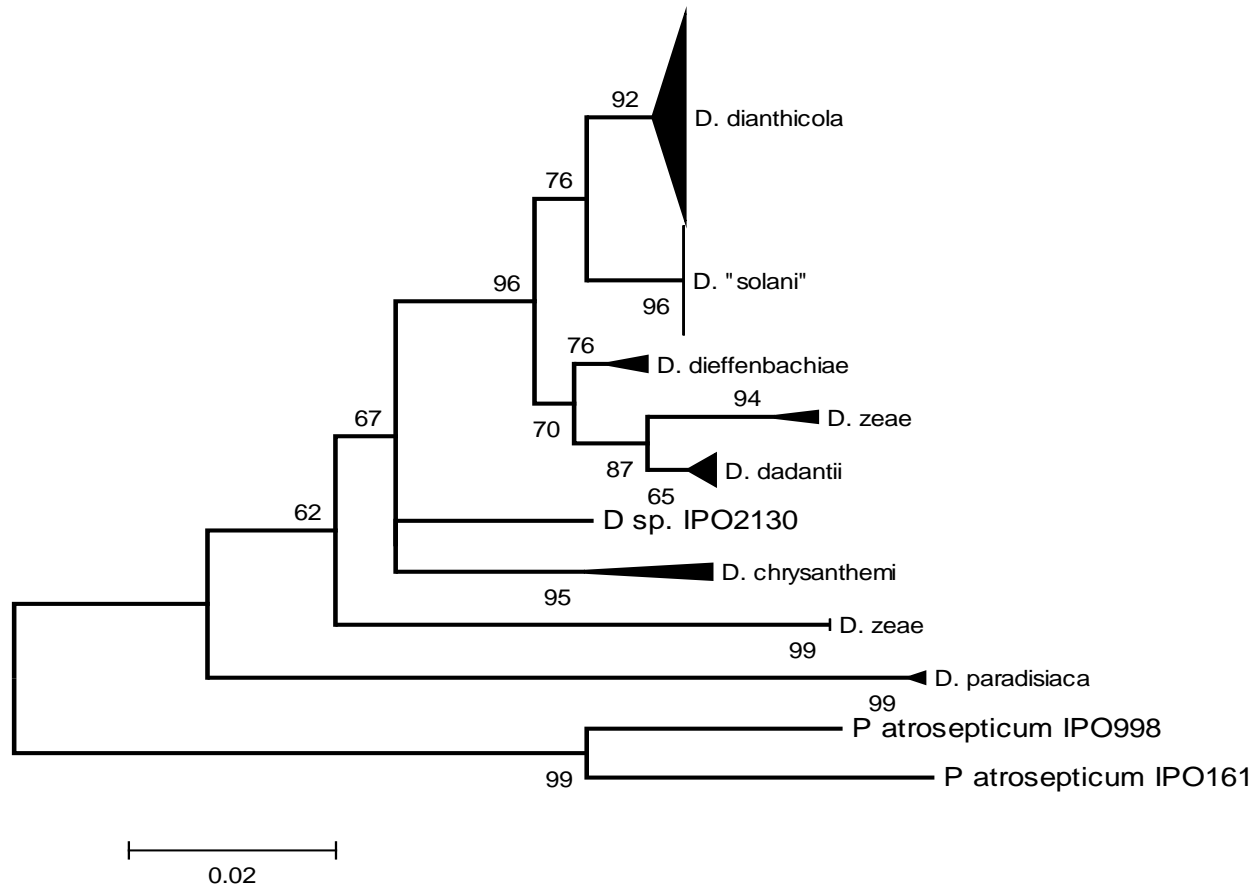
В 2011 г. впервые в РФ диагностировали на картофеле карантинного патогена *Ralstonia solanacearum*

В 2012 г. - Candidatus *Liberibacter solanacearum*

Dickeya solani



Эволюционные отношения 106 фрагментов гена *dnaX*, показывающие все геномовиды рода *Dickeya*



Фитопатогены, диагностика патогенов, биологические СЗР

<u>Год</u>	<u>Обследованные области</u>	<u>Образцов</u>	<u>Методы</u>	<u>Частота, %</u>
2001-04 гг..	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Самарская, Воронежская, Липецкая, Псковская, Новгородская, Калининградская, Свердловская, Магаданский край	487	Биохимические, последовательности генов <i>16S рРНК</i> , <i>recA</i>	0*
2009-11 гг..	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Ленинградская, Воронежская, Липецкая, Псковская, Калининградская, Нижегородская	350	ПЦР с праймерами ADE1/2 (ген <i>pelD</i>), последовательности генов <i>acnA</i> , <i>dnaX</i> , <i>gapA</i> , <i>icdA</i> , <i>mdh</i> , <i>mtlD</i> , <i>pgi</i> и <i>pelD</i>	3,6-7,3
2012 г.	Московская, Тульская, Калужская	80	ПЦР в реальном времени с праймерами ADE1/2	13,8-15,6
2013 г.	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Самарская, Тверская, Тамбовская, Воронежская, Курская, Орловская.	386	ПЦР в реальном времени с праймерами ADE1/2	26,0-28,6

Максимальный ущерб в поле наносят:

Оомицеты: *Phytophthora infestans*, *Pythium spp.*

Грибы: *Colletotrichum coccodes*, *Alternaria spp.*, *Cercospora concors*, *Puccinia pittieriana*, *Aecidium cantensis*, *Fusarium spp.*, *Phoma solanicola*, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizoctonia solani*, *Septoria lycopersici*, *Helminthosporium solani*, *Sclerotium spp.*, *Ulocladium atrum*, *Verticillium spp.*, *Synchytrium endobioticum*.

Простейшие: *Spongospora subterranea f.sp. Subterranean*.

Обнаружены 39 вирусов, поражающих картофель, среди них:

Potato aucuba mosaic virus, Potato black ringspot virus, Potato deforming mosaic virus, Potato latent virus, Potato leafroll virus, Potato mop-top virus (spraing of tubers), Potato rugose mosaic, Potato stem mottle (spraing of tubers), Potato spindle tuber, Potato yellow dwarf virus, Potato yellow mosaic virus, Potato yellow vein virus, Potato yellowing virus, Potato virus A, Potato virus M, Potato virus S, Potato virus T, Potato virus U, Potato virus V, Potato virus X, Potato virus Y

Перспективные направления защиты картофеля от болезней:

- 1) Биопрепараты на основе бактерий-антагонистов
 - 2) Бактериофаги, бактериофаги + бактерии носители
 - 3) Наночастицы серебра и меди
 - 4) Наночастицы + антисмысловые РНК, подавляющие экспрессию генов восприимчивости растений
 - 5) Генетическая устойчивость растений, включая геномное редактирование
-

Учредители Программы: ООО «Дока – Генные Технологии», ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия», ООО «МикроБиоФарм», при поддержке Агропромпарка «Рогачево», РГАУ МСХА им. К.А.Тимирязева, ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии.

Участники Программы: заинтересованные студенты старших курсов, выпускники высших учебных заведений, соискатели и аспиранты.

Научные и технологические направления Программы:

- Селекция, генетика и геномика растений.
- Биотехнология растений.
- Фитопатология и диагностика патогенов.
- Биологические средства защиты растений.

Календарь 2017 года:

- Конкурс письменных работ (эссе) (февраль – апрель 2017 г.) -> Отбор команды для летней научно-производственной практики и Летней Школы (апрель 2017 г.).
- Летняя научно-производственная практика (для студентов) и сезонная работа (для выпускников и аспирантов) в компаниях-резидентах Агропромпарка «Рогачево» в выбранных научно-технологических направлениях (май – август 2017 г.).
- Летняя Школа (август 2017 г.) – лекции, семинары ведущих ученых; практикумы, индивидуальные консультации - > отбор сотрудинок для постоянной работы в компаниях.
- Работа в компаниях-резидентах (с сентября 2017 г.), продолжение направленного обучения в Учебном центре ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, аспирантурах ВНИИСБ, ИБХ, МГУ.

Основой Эссе являются:

1. Публикации по теме проекта в российской и международной научной периодической литературе, **ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО** в рецензируемых журналах и сборниках (рецензируемых Web of Science, SCOPUS, PubMed, Agricola, CABI).
2. Материалы справочников и учебных пособий по генетике, геномике, молекулярной биологии, селекции растений, биотехнологии, фитопатологии, защите растений, и других специальных дисциплин.
3. Результаты собственных научных исследований (при их наличии).

Оптимальный объем Эссе 25 страниц.

Эссе будет проверяться на заимствования текста.

Подготовленные Эссе направляются в срок до 10 апреля 2017 года на электронную почту:

summer@dokagene.ru

Организаторы Программы до 25 апреля 2017 года рассматривают поступившие работы и отбирают участников Летней Школы - 2017.

Дополнительная информация на сайтах компаний – www.dokagene.ru, www.phytoengineering.ru, www.microbiofarm.ru
