

STOLEPCHENKO V.A.², VASKO P.P.², KONDRATSKAYA I.P.¹, FOMENKO T.I.¹

¹ Central Botanical Garden of NAS of Belarus,

² SPS of Agriculture of NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, str. Surganova, 2v, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO SELECTING OF CREATION OF ALOPECURUS INTERSPECIFIC HYBRIDS

Aims. The first attempt to work out genomic technology selection *Alopecurus platensis* L. was made with the purposeful aim to convert genome and to expand gene pool of initial material and increase efficiency of selection. **Methods.** The subject of exploring were parental and hybrid forms *A. platensis* and *A. ventricosus* Pers. **Results.** Hybrid plants were characterized by seed and feed efficiency, by content of total protein and soluble carbohydrates. A variability polypeptide spectrum of total proteins was detected among hybrid plants confirmed by coefficient of similarity.

Key words: *Alopecurus*, hybrid plants, selection, protein.

УРБАНОВИЧ О.Ю.,¹ КУЗМИЦКАЯ П.В.,¹ КОЗЛОВСКАЯ З.А.,² АНОШЕНКО Б.Ю.³

¹ ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси"

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

² РУП "Институт плодородства"

Республика Беларусь, 223013, Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

³ ЦБС НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

ГОМОЛОГ ГЕНОВ *HcrVf* СЕМЬИ ЯБЛОНИ ИЗ ГЕНОМА ГРУШИ

Парша груши является опасным заболеванием этой культуры. Оно вызывается грибными патогенами рода *Venturia*. Сорты груши могут поражаться двумя видами *Venturia*. Уссурийская груша (*P. ussuriensis* Maxim.), груша Бретшнейдера (*P. bretschnideri* Rehd.) и груша грушелистная (японская) (*P. pyrifolia* Naka) восприимчивы к *V. nashicola*, а европейская груша (*P. communis* L.) – к *V. pirina* Aderh. [1, 2].

На пораженных паршой плодах и листьях возникают темные бархатистые пятна, при сильном поражении дерева его плоды трескаются, а листья осыпаются. Помимо этого, пораженные деревья менее морозостойки. По данным разных авторов, потери урожая груши от парши могут составлять от 50 до 70%.

Большинство возделываемых в Европе сортов груши являются в той или иной степени восприимчивыми к парше [3]. Поэтому в селекции груши приоритетным становится направление по созданию высокопродуктивных сортов, имеющих генетическую устойчивость к парше в сочетании с хорошим качеством плодов [4]. С этой целью ведется направленный поиск аллельных форм генов, обеспечивающих такую устойчивость, с целью последующего их внедрения в геномы вновь создаваемых сортов.

На сегодняшний день число известных генов груши, отвечающих за устойчивость к парше, невелико. Исследование межвидовых гибридов

груши позволило идентифицировать ген *Vn*, обеспечивающий устойчивость к *V. nashicola* [5]. В геноме японской груши сорта Kinchaku обнаружен ген *Vnk*, [6]. Он также обеспечивает устойчивость к *V. nashicola*. как и ген *Rvn2*, картированный в геноме сорта европейской груши Bartlett [7]. Идентифицированный позже у сорта европейской груши Navaга ген *Rvp1* определяет устойчивость к виду к *V. pirina* [3]. В геноме груши обнаружено также два больших QTL локуса на 3 и 7 хромосомах, ассоциированные с устойчивостью к *V. pirina* [8].

О генах яблони, обеспечивающих устойчивость к парше, известно больше [9, 10]. Клонированы и описаны гены-гомологи, получившие название *HcrVf* [11, 12]. Один из этих гомологов является функционально активным и ассоциирован с устойчивостью яблони к парше [13]. Геном груши и яблони имеет много общего в структуре и организации. [14, 15]. Их нуклеотидные последовательности идентичны на 96.35% [16]. Существует высокая вероятность, что геном груши также содержит гены устойчивости к парше, гомологичные *HcrVf* генам яблони, которые могут обладать функциональной активностью. В связи с этим, целью данного исследования являлось выделение из генома устойчивого к парше сорта груши последовательности, гомологичной *HcrVf* генам яблони, и анализ ее структуры.

Материалы и методы

Исследования проводили на двух различных генотипах, один из которых – Память Яковлева – был охарактеризован как устойчивый, в то время как второй – сортообразец № 90-39/65 являлся восприимчивым.

Поиск в геноме груши сорта Память Яковлева последовательностей, гомологичных генам *Vf*-кластера яблони проводили с помощью ДНК-маркеров к *Vf*-генам яблони. Предположительный гомолог одного из генов *Vf*-кластера яблони был найден в геноме устойчивого сорта с помощью праймеров FD5for (5'-ATGGAGAGAACCATGAGAGTTG-3') и FD5rev (5'-TACTGGCATATTCGTCGCAG-3'), амплифицирующих открытую рамку считывания гена *hcrVf2*, отвечающего за устойчивость видов рода *Malus* к возбудителю парши яблони *V. inaequalis* [17]. Амплификацию проводили в соответствии с [17]. У восприимчивого сортообразца отсутствовала одна из полос амплификации данного маркера. Остальные маркеры, использованные в исследовании, не выявили полиморфизма между изучаемыми генотипами (данные не представлены).

Продукты амплификации разделяли в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo scientific (EC)).

Полученный продукт амплификации раз-

Результаты и обсуждение

Сорт груши Память Яковлева характеризуется высокой устойчивостью к парше. Он был получен в результате скрещивания сорта Тёма с французским сортом Оливье де Серр. Сорт Тёма представляет собой межвидовой гибрид сорта европейской груши Финляндская желтая с уссурийской грушей.

Для выделения гомологов *HcrVf* семьи из генома груши был использован метод ПЦР-основанного клонирования. В результате амплификации с праймерами FD5, ограничивающими открытую рамку считывания генов-гомологов *HcrVf* семьи, в геноме устойчивого к парше сорта груши Память Яковлева выявлялся фрагмент длиной 3081 п.н. У восприимчивого образца 90-39/65 данный фрагмент отсутствовал. Фрагмент был клонирован и затем секвенирован в прямом и обратном направлении с помощью дополнительных праймеров к его внут-

мером около 3000 п.н. был выделен из геля с помощью GeneJet™ Gel Extraction Kit (Thermo scientific (EC)). Выделенные фрагменты лигировались в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *E.coli* DH5α с помощью InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендациям производителя. Клонирование в плазмиду pTZ57R/T и последующую трансформацию *E. coli* DH5α проводили при помощи Plasmid GeneJet™ Miniprep Kit (Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя. После посева на селективную среду и отбора трансформантов проводили выделение плазмидной ДНК, содержащей исследуемую последовательность, с помощью GeneJet™ Gel Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендованному протоколу. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13 и внутренних праймеров к клонированной последовательности. Для проведения реакции секвенирования использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Амплификацию для секвенирования и очистку полученных продуктов амплификации проводили в соответствии с методикой производителя. Компьютерный анализ полученной нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программного обеспечения, предоставленного на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ренней части. Последовательность получила название Puvf1.

Сравнение нуклеотидной последовательности Puvf1 с базой данных GenBank показало, что она имеет высокую степень гомологии с последовательностями *HcrVf* семьи яблони. Результат представлен в таблице. В частности, степень идентичности последовательности Puvf1 из генома груши и последовательности *HcrVf2* генам яблони, которая ассоциирована с устойчивостью к парше, составляет 93.1%.

Поиск по базе данных Plant Resistance Genes (<http://www.prgdb.org>), содержащей более 16 000 известных и гипотетических R-генов 192 видов растений, отвечающих за устойчивость к 115 различным патогенам, также выявил гомологию изучаемой последовательности с R-генами других растений.

Таблица. Степень идентичности нуклеотидной последовательности Ruvf1 с последовательностями HcrVf семьи яблони

| Номер доступа в GenBank | Название гена | Источник гена | Длина посл-ти, п.н. | % попарной идентичности | E Value |
|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------|
| AJ297739 | <i>hcrvf1</i> | <i>Malus floribunda</i> | 1109 | 92,5 | 0 |
| AJ297740 | <i>hcrvf2</i> | <i>Malus floribunda</i> | 1822 | 93.1 | 0 |
| AJ297741 | <i>hcrvf3</i> | <i>Malus floribunda</i> | 1929 | 93.1 | 0 |

Среди генов, обеспечивающих устойчивость к различным возбудителям, на сегодняшний день наиболее изучен кластер так называемых R-генов. Устойчивость, определяемая этими генами, обеспечивается реакцией гиперчувствительности, ведущей к гибели зараженной клетки, что препятствует дальнейшему распространению патогена. Считается, что продукты R-генов являются рецепторами, взаимодействующими с белками, кодируемыми *Avr*-генами патогена. Такое взаимодействие запускает сигнальный каскад, в результате которого активируется система защиты растений от патогена [18].

По своей структуре R-гены представляют собой достаточно гетерогенную группу. Чаще всего в структуре белков, кодируемых R-генами, отмечают протеинкиназные каталитические домены и переменное число лейцин-богатых повторов (LRR). LRR участвуют в связывании лигандов за счет белок-белковых взаимодействий. Клеточная локализация белковых продуктов R-генов различна. Часть из них является цитоплазматическими белками (некоторые – прикрепленными к цитоплазматической мембране), в то время как другие представляют собой рецептороподобные структуры, имеющими внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены [6].

Среди растений первый кластер R-генов, названный *Cf*, был найден у томата [18]. Впоследствии гомологичные области были описаны у многих растений, находящихся довольно далеко от томата в эволюционном отношении. Первичное заключение о функции генов было сделано на основе гомологии с генами *Cf* кластера томата, позже его подтвердили экспериментально [13].

Представленный анализ сиквенированной последовательности позволяет сделать вывод о ее гомологии с R-генами (рис.), в частности, с геном яблони *hcrvf2*, участие которого в формировании устойчивости к *V. inaequalis* было доказано путем трансформации восприимчивого сорта [13]. Последовательность Ruvf1 имеет также высокую степень гомологии с последовательностями генов рецептор-подобных белков видов *M. × domestica*, *M. floribunda*, *M. micro-malus*, *M. baccata* и др., что говорит об общности их происхождения. Однако общность происхождения Ruvf1 и *hcrvf2* не позволяет сделать заключение относительно того, будет ли этот ген обеспечивать устойчивость его носителей к *V. pirina*. Но, тем не менее, изученная последовательность является хорошим кандидатом для последующего анализа на предмет ее функциональности.

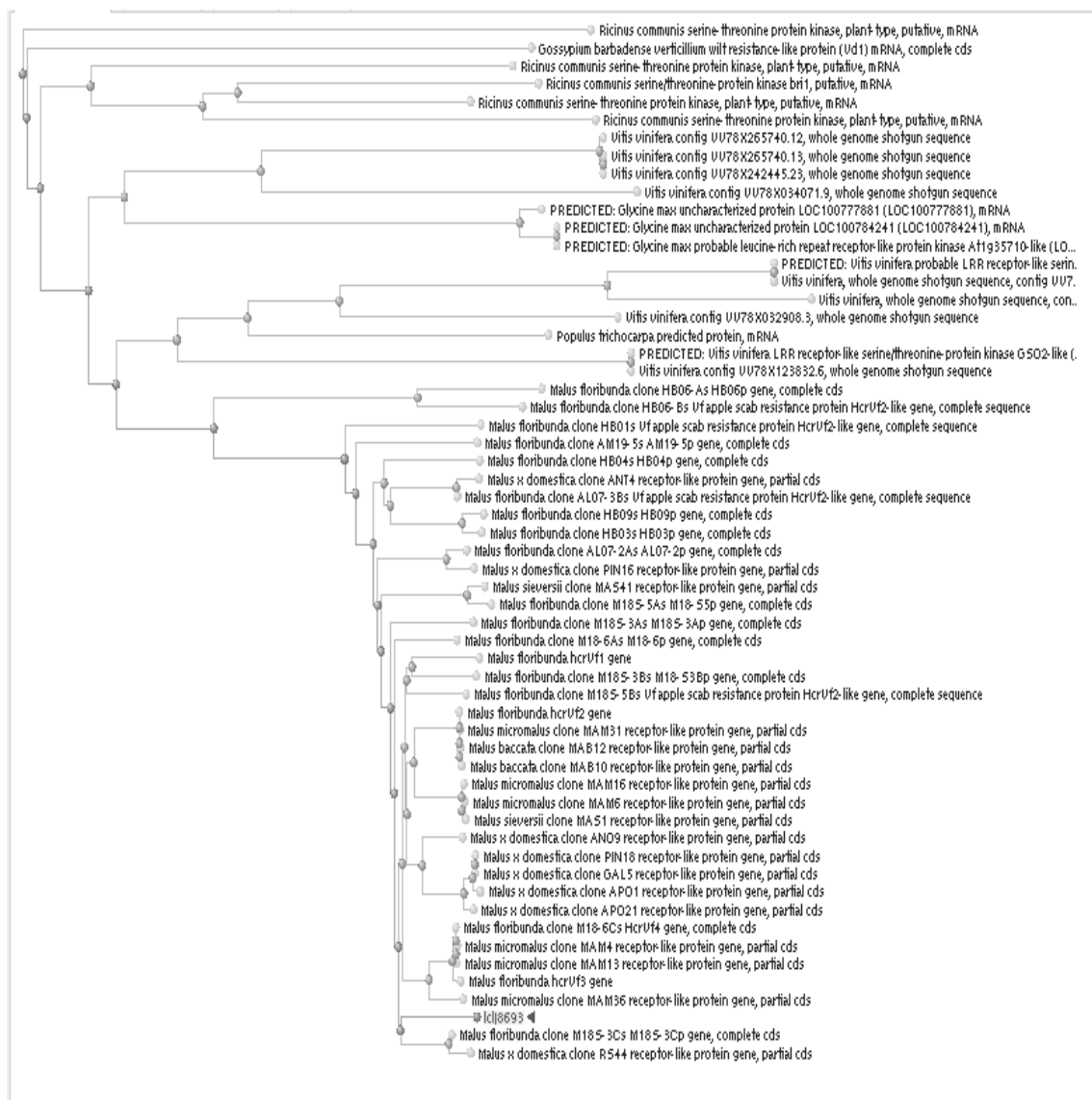


Рис. Дендрограмма сходства нуклеотидной последовательности с аннотированными последовательностями GenBank. Анализируемая последовательность генома груши обозначена lclj8693

Литература

1. Tanaka S., Yamamoto K. Studies in pear scab. II. Taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab // Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. – 1964. – Vol. 29. – P. 128–136.
2. Langford M.H., Keitt E.N. Heterothallism and variability in *Venturia pirina* // Phytopathology. – 1942. – Vol. 32. – P. 357–369.
3. Bouvier L., Bourcy M., Boulay M. et al. A new pear scab resistance gene *Rvp1* from the European pear cultivar 'Navara' maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2 // Tree Genet. and Genom. – 2012. – Vol. 8. – P. 53–60.
4. Lespinasse Y., Chevalier M., Durel C.E. et al. Pear breeding for scab and *Psylla* resistance // Acta Hort. – 2008. – Vol. 800. – P. 475–481.
5. Abe K., Kotobuki K., Sato T. et al. Inheritance of resistance to pear scab from European pears to Asian pears // J. Jpn. Soc. Hort. Sci. – 2000. – Vol. 1. – P. 1–8.
6. Terakami S., Shoda M., Adachi Y. et al. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol. 113. – P. 743–752.
7. Cho K.H., Shin I.S., Kim K.T. et al. Development of AFLP and CAPS markers linked to the scab resistance gene, *Rvn2*, in an inter-specific hybrid pear (*Pyrus* spp.) // J. Hort. Sci. Biotechnol. – 2009. – Vol. 84. – P. 619–624.
8. Pierantoni L., Dondini L., Cho K.-H. et al. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map // Tree Genet. and Genom. – 2007. – Vol. 3. – P. 311–317.

9. Bus V., Rikkerink E., Aldwinckle H.S. et al. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races // Acta Hort. – 2009. – Vol. 814. – P. 739-746.
10. Patocchi A., Frei A., Frey E. et al. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes // Mol Breed. – 2009. – Vol. 24, №4. – P. 337-347.
11. Vinatzer B., Patocchi A., Gianfranceschi L. et al. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2001. – Vol. 14. – P. 508-515.
12. Xu M. L., Korban S. S. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease // Genetics. – 2002. – Vol. 162. – P. 1995-2006.
13. Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S. et al. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 886-890.
14. Yamamoto T., Kimura T., Terakami S. et al. Integrated genetic linkage maps for pear based on SSR and AFLP markers // Breeding Science. – 2007. – Vol. 57. – P. 321-329.
15. Celton J.-M., Chagne D., Tustin D.S. et al. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus* // BMC Research Notes. – 2009. – Vol. 2. – P. P182.
16. Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J. e.a. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* (Borkh.) // Nature genetics. – 2010. – Vol. 42, №10. – P. 833-841.
17. Broggin G.A.L., Galli P., Parravicini G. et al. *HcrVf* paralogs are present oh linkage groups 1 and 6 of *Malus* // Genome. – 2009. – Vol. 52. – P. 129-138.
18. Thomas C.M., Dixon M.S., Parniske M. et al. Genetics and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance of *Cladosporium fulvum* // Phiols. Trans. R. Soc. Lond. – 1998. – Vol. 353. – P. 1413-1424.

URBANOVIKH O.Yu.,¹ KUZMITSKAYA P.V.,¹ KAZLOVSKAYA Z.A.,² ANOSHENKO B.Yu.³

¹ Institute of Genetic and Cytology

Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

² Institute of Fruit Growing

Belarus, 230132, Minsk region, Samokhvalovichi, Kovaleva str., 2

³ Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2v

HOMOLOGUE OF *HcrVf* GENES FROM PEAR GENOME

Aims. The aim of this research was isolation and structure analysis of the sequence homologous to *HcrVf* genes, which associated with resistant to apple scab, from pear genome resistant to scab. **Methods.** The method of PCR-based cloning was used for isolation of the homologue *HcrVf* from pear genome. **Results.** The sequence homologue to the sequences *HcrVf* genes apple was isolated from the pear genome of the variety 'Pamiat Yakovleva' resistant to pear scab. The degree of identity between the isolated sequence and the Genebank database sequence of the gene *HcrVf2* associated with scab apple resistance was 93,1%. The high degree of identity between the pear sequence and homologues apple R genes was also shown. **Conclusions.** The cloned nucleotide sequence of pear is the homologue to the genes of R-type resistance. **Key words:** pear, scab, apple, *HcrVf* genes, nucleotide sequence.

ФОМИНА И.Р.^{1,2}, КРЕСЛАВСКИЙ В.Д.¹, БАЛАХНИНА Т.И.¹, ГЕРЦ С.М.¹, ИВАНОВ А.А.¹, КОСОБРЮХОВ А.А.¹, ЛЮБИМОВ В.Ю.¹, НАЗАРОВА Г.Н.¹, БИЛЬ К.Я.^{1,2}

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Россия, 142290, Московская обл., г. Пуцино, ул. Институтская, 2, e-mail: irafomi@rambler.ru

²Biosphere Systems International Foundation

USA, 85755, Arizona

СТРЕСС РЕАКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С НАРУШЕННЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ГЕНАМИ

Ранее было показано [1], что при повышенном освещении (300 мкЕ м⁻² с⁻¹) мутанты: *Synechococcus* sp. PCC 7942 (далее PCC 7942) с

нарушенным *sodB* геном [2] и *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее PCC 6803) с нарушенным *katG* геном [3], - растут медленнее, чем их дикие