

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. Brogini 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.,<sup>1</sup> KUZMITSKAYA P.V.,<sup>1</sup> KAZLOVSKAYA Z.A.,<sup>2</sup> ANOSHENKO B.Yu.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Genetic and Cytology*

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

<sup>2</sup> *Institute of Fruit Growing*

*Belarus, 230132, Minsk region, Samokhvalovich, Kovaleva str., 2*

<sup>3</sup> *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.<sup>1,2</sup>, КРЕСЛАВСКИЙ В.Д.<sup>1</sup>, БАЛАХНИНА Т.И.<sup>1</sup>, ГЕРЦ С.М.<sup>1</sup>, ИВАНОВ А.А.<sup>1</sup>, КОСОБРЮХОВ А.А.<sup>1</sup>, ЛЮБИМОВ В.Ю.<sup>1</sup>, НАЗАРОВА Г.Н.<sup>1</sup>, БИЛЬ К.Я.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Институт фундаментальных проблем биологии РАН*

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

<sup>2</sup> *Biosphere Systems International Foundation*

*USA, 85755, Arizona*

#### **СТРЕСС РЕАКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С НАРУШЕННЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ГЕНАМИ**

Ранее было показано [1], что при повышенном освещении (300 мкЕ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) 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

штаммы. При регистрации световой кривой  $\text{CO}_2$ -зависимого выделения  $\text{O}_2$  уровень максимальной скорости выделения кислорода у мутанта *sodB* PCC 7942 был ниже, чем у других штаммов. В условиях фотоингибирования (60 мин облучения светом интенсивностью  $1200 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  в присутствии  $80 \text{ мкМ}$  хлорамфеникола или спектиномицина в инкубационной среде) оба мутантных штамма не обнаруживали подавления светолIMITИРОВАННОГО выделения  $\text{O}_2$  большего, чем у диких типов, но *sodB* мутант проявлял тенденцию к усиленному подавлению светонасыщенного выделения  $\text{O}_2$  [1]. Эти ре-

### Материалы и методы

Культуры цианобактерий выращивали в альгологическом культиваторе на жидкой среде BG-11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution 50X, Sigma, США) с добавлением  $10 \text{ мМ}$   $\text{NaHCO}_3$ , при освещенности  $30 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ , температуре  $28^\circ\text{C}$  и постоянной аэрации воздухом, обогащенным  $3\%$   $\text{CO}_2$ , как описано ранее [6]. Рост культур оценивали по изменению оптической плотности при  $750 \text{ нм}$  ( $A_{750}$ ) на спектрофотометре Genesys 10uv (ThermoSpectronic, USA). На стадии линейного увеличения роста ( $A_{750}$ ) клетки осаждали центрифугированием при  $1000 \text{ g}$   $10 \text{ мин}$ , ресуспендировали в свежей среде, доводили до оптической плотности  $A_{750} = 0,5$ , добавляли (в опытные варианты) метилвиологен в конечной концентрации  $0,5 \text{ мкМ}$  и регистрировали рост культур в течение  $48 \text{ час}$ .

Скорость  $\text{CO}_2$ -зависимого выделения  $\text{O}_2$  определяли с помощью стандартного электрода Кларка в суспензии целых клеток в термостати-

### Результаты и обсуждение

Метилвиологен в концентрации  $0,5 \text{ мкМ}$  вызывал сильный стресс у *sodB*-мутанта PCC 7942, но не оказывал заметного влияния на рост и фотосинтез *katG*-мутанта PCC 6803 и обоих диких штаммов (PCC 7942, PCC 6803). Полное подавление роста (рис. 1), значительное снижение уровня  $\text{CO}_2$ -зависимого выделения  $\text{O}_2$  (рис. 2) и относительной амплитуды медленной компоненты ЗФ (данные не представлены) наступало у *sodB*-мутанта PCC 7942 в течение  $4\text{--}6 \text{ час}$  инкубации в среде с  $0,5 \text{ мкМ}$  метилвиологеном. Дикий штамм PCC 7942 оставался мало затронутым в течение  $48 \text{ час}$ . Нарушение фотосинтетической активности *sodB*-мутанта PCC 7942 не сопровождалось заметным изменением содержания хлорофилла и отношения каро-

зультаты убеждают, что ни один из генов (*sodB* и *katG*) не участвует в защите фотосистемы II (ФС II) от фотодеструкции. Было установлено [2, 4, 5], что *sodB* мутант PCC 7942 чувствителен к окислительному воздействию на участках электрон-транспортной цепи, примыкающих к ФС I.

В настоящей работе для развития представлений о физиологической роли генов *sodB* и *katG* в фототрофных клетках, исследовано влияние  $0,5 \text{ мкМ}$  метилвиологена на культуры данных мутантов.

рованной ( $28^\circ\text{C}$ ) полярографической ячейке с использованием полярографа LP-7 (Praha). Источником света служил облучатель ЛЭТИ (Россия), измерения проводили при насыщающем освещении  $1000 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ . Перед экспериментом клетки цианобактерий ресуспендировали в свежей среде (BG-11 +  $10 \text{ мМ}$   $\text{NaHCO}_3$ ) и доводили до оптической плотности  $A_{750} = 0,5$ .

Изменение замедленной миллисекундной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла а, часто используемое в качестве быстрого и чувствительного метода оценки активности фотосинтетического аппарата, регистрировали с помощью модифицированного дискового фосфороскопа [6]

Содержание пигментов измеряли в ацетонных экстрактах предварительно осажденных клеток [7].

Активность каталазы определяли в суспензии целых клеток спектрофотометрически [3].

тин/хлорофилл (табл. 1), но сопровождалось значительным увеличением активности каталазы (табл. 2).

Ранее [4,5], изучение *sodB*-мутанта PCC 7942 показало, что циклический транспорт электронов и реакционный центр P700 служат мишенями супероксидрадикала ( $\text{O}_2$ ), формирующегося в ФС I, и цитозольная супероксиддисмутаза (Fe-COD) защищает эти мишени от окислительного повреждения. Первичной мишенью, нарушаемой метилвиологеном в отсутствие *sodB* гена, кодирующего Fe-COD, является циклический транспорт электронов ФС I. Это наблюдение согласуется с представлениями о чувствительности Fe4S4 кластеров ФС I к  $\text{O}_2$ .

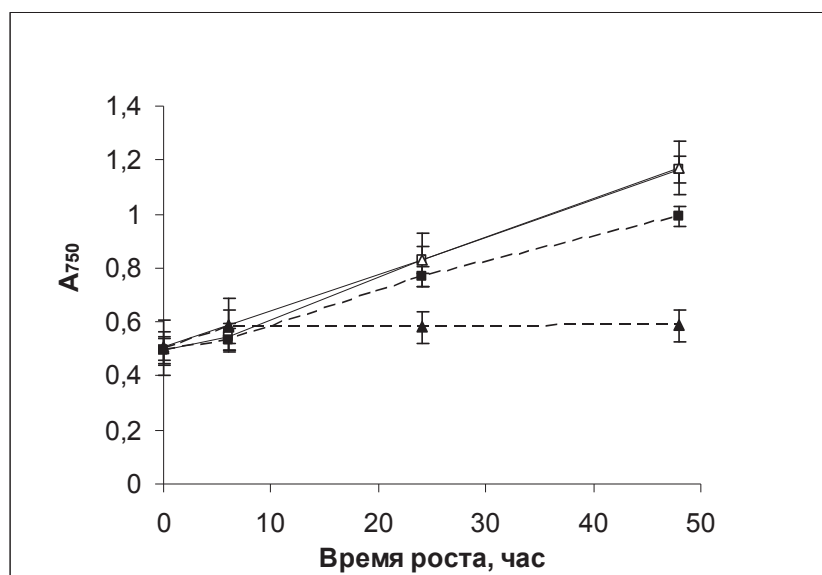


Рис. 1. Рост культур дикого типа (□, ■) и *sodB* мутанта (Δ, ▲) цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 в нормальных условиях (□, Δ) и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена (■, ▲);  $n = 7$

Таблица 1. Содержание хлорофилла (Хл) и отношение каротин/хлорофилл в клетках дикого типа и *sodB* мутанта цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 при выращивании культур в нормальных условиях и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена (МВ)

<i>Synecho-coccus</i> sp. PCC 7942	Время роста, час	Хл, мкг·10 <sup>-6</sup> клеток (среднее ± SD; $n = 5$ )		Каротин/хлорофилл (среднее ± SD; $n = 5$ )	
		Контроль	0,5 мкМ МВ	Контроль	0,5 мкМ МВ
Дикий тип	6	0,163 ± 0,027	0,167 ± 0,001	5,75 ± 0,13	5,76 ± 0,06
	24	0,161 ± 0,011	0,155 ± 0,003	5,97 ± 0,38	5,87 ± 0,31
	48	0,151 ± 0,003	0,166 ± 0,002	5,92 ± 0,36	5,90 ± 0,11
<i>sodB</i> мутант	6	0,136 ± 0,012	0,121 ± 0,027	6,26 ± 0,44	6,12 ± 0,25
	24	0,130 ± 0,019	0,098 ± 0,011	5,84 ± 0,69	5,78 ± 0,39
	48	0,131 ± 0,009	0,105 ± 0,021	5,74 ± 0,19	5,67 ± 0,23

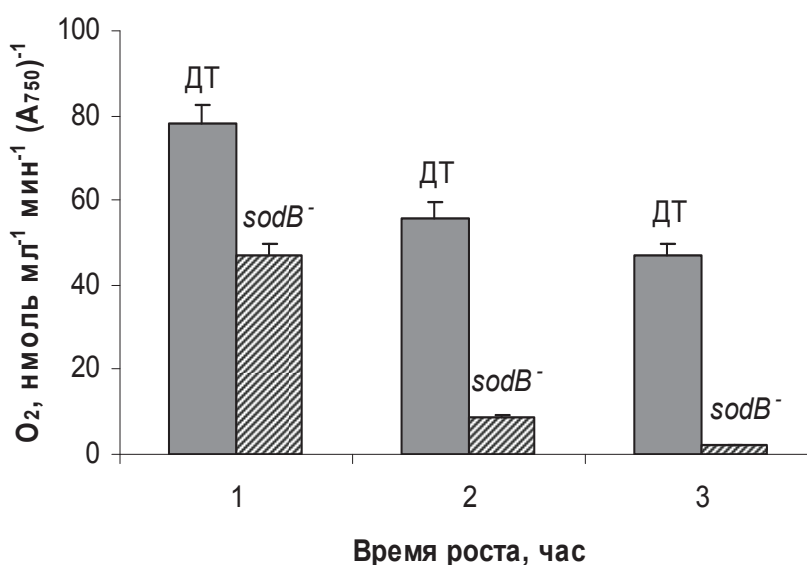


Рис. 2. Скорость светонасыщенного (1000 мкЕ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) CO<sub>2</sub>-зависимого выделения O<sub>2</sub> клетками дикого типа (ДТ) и *sodB*- мутанта (*sodB*-) цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 после роста культур в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена

Таблица 2. Активность каталазы в клетках дикого типа и *sodB*<sup>-</sup> мутанта цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 при выращивании культур в нормальных условиях и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена

<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Время роста, час	Активность каталазы, мкмоль мин <sup>-1</sup> 10 <sup>-6</sup> клеток (среднее ± SE; n = 5)	
		Контроль	0,5 мкМ МВ
Дикий тип	4	12,40 ± 0,66	14,39 ± 0,78
	6	12,68 ± 0,67	11,15 ± 0,15
	30	12,35 ± 0,15	16,91 ± 0,22
	50	11,56 ± 0,59	11,39 ± 0,63
<i>sodB</i> <sup>-</sup> мутант	4	13,54 ± 0,35	35,63 ± 0,43
	6	12,85 ± 0,36	37,89 ± 0,76
	30	11,89 ± 0,22	36,42 ± 0,46
	50	15,53 ± 0,22	38,30 ± 0,46

### Выводы

Потеря активности каталазы у *katG*<sup>-</sup> мутанта цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 не усиливает чувствительность к метилвиологену, поскольку Fe-СОД остается активной. Однако если Fe-СОД отсутствует, как у *sodB*<sup>-</sup> мутанта

цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942, активация каталазы служит адаптивным ответом на окислительный стресс, индуцированный метилвиологеном, позволяющим выжить, если не продолжать рост.

### Литература

- Fomina I.R., Balakhnina T.I., Hertz S.M., Ivanov A.A., Ivanova E.P., Kosobryukhov A.A., Lyubimov V.Yu., Nazarova G.N., Serdyuk O.P., Smolygina L.D., Bil' K.Y., Herbert S.K. Effects of high light on growth and photosynthesis in *Synechocystis* and *Synechococcus* mutants deficient in antioxidant genes / Материалы V Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». – Москва-Пушино: Издательство Российского университета дружбы народов, 2003. – Т. 3. – С. 162–164.
- Herbert S.K., Samson G., Fork D.C., Laudenbach D.E. Characterization of damage to photosystems I and II in a cyanobacterium lacking detectable iron superoxide dismutase activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 8716–8720.
- Tichy M., Vermaas W. *In vivo* role of catalase-peroxidase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P.1875-1882.
- Thomas D.J., Avenson T.J., Thomas J.B., Herbert S.K. A cyanobacterium lacking iron superoxide dismutase is sensitized to oxidative stress induced with methyl viologen but is not sensitized to oxidative stress induced with norflurazon // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 116. – P. 1593–1602.
- Thomas D.J., Thomas J.B., Prier S.D., Nasso N.E., Herbert S.K. Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC 7942 // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 275–282.
- Креславский В.Д., Фомина И.Р., Кособрюхов А.А., Херберт С.К., Бабыкин М.М., Биль К.Я. Действие индукторов окислительного стресса на фотосинтетический аппарат клеток устойчивого к метилвиологену мутанта Prq20 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биофизика. – 2007. – Т. 52. – С. 277–286.
- Myers J., Graham J.R., Wang R.T. Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants // Plant Physiol. – 1980. – Vol. 66. – P. 1144–1149.

**FOMINA I.R.<sup>1,2</sup>, KRESLAVSKI V.D.<sup>1</sup>, BALAKHNINA T.I.<sup>1</sup>, HERTZ S.M.<sup>1</sup>, IVANOV A.A.<sup>1</sup>, KOSOBRYUKHOV A.A.<sup>1</sup>, LYUBIMOV V.YU.<sup>1</sup>, NAZAROVA G.N.<sup>1</sup>, BIEL K.Y.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Basic Biological Problems RAS*

*Russia, 142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya str. 2, e-mail: irafomi@rambler.ru*

<sup>2</sup>*Biosphere Systems International Foundation*

*USA, 85755, Arizona*

### STRESS REACTIONS IN CYANOBACTERIA LACKING ANTIOXIDANT GENES

**Aims.** To improve understanding of the roles of antioxidant genes in phototrophic cells the effects of 0,5μM methyl viologen (MV) on the *sodB*<sup>-</sup> mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942 and the *katG*<sup>-</sup> mutant of

*Synechocystis* sp. PCC 6803 were examined. *Methods.* Cultures were grown in liquid BG11 medium at  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . *Results.*  $0,5 \mu\text{M}$  MV inhibited growth and photosynthetic activity in the *sodB*<sup>-</sup> mutant within 8 hr. The PCC 7942 wild type as well the PCC 6803 wild type and its *katG*<sup>-</sup> mutant remained nearly unaffected for 48 hr. The oxidative damage to the *sodB*<sup>-</sup> mutant was not accompanied by essential changes in pigment content but was accompanied by greater catalase activity. *Conclusions.* Lack of catalase activity in the *katG*<sup>-</sup> mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 does not sensitize to MV because iron superoxide dismutase (Fe-SOD) is active. However, if the Fe-SOD is absent, as in the *Synechococcus* sp. PCC 7942 *sodB*<sup>-</sup> mutant, activation of catalase appears to be an adaptive response to MV that may allow survival.

**Key words:** *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, methyl viologen.

**ШЕСТОПАЛ О.Л., ЗАМБРІБОРЩ І.С., ТОПАЛ М.М., ЛІТВИНЕНКО М.А., ІГНАТОВА С.О.**

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: oksana\_shestopal@mail.ru

### ВИВЧЕННЯ ГАПЛОПРОДУКЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНИМИ ТРАНСЛОКАЦІЯМИ

Селекційна цінність сортів м'якої пшениці, які несуть транслокації 1RS.1BL та 1RS.1AL, обумовлена стійкістю цих рослин до абіотичних та біотичних чинників. Ділянка хромосоми, що несе транслокацію 1RS.1BL містить гени стійкості до грибних патогенів: бурої іржі (Lr26), стебловий іржі (Sr31), жовтої іржі (Yr9) і борошністої роси (Pm8), а 1RS.1AL транслокація від жита *Insave* (сорт *Amigo*) несе ген стійкості до двох біотипів тлі *Schizaphis graminum*, кліща *Aceria tosicheilla* (Keifer) та ген стійкості до борошністої роси *Pm17* [1]. Слід відмітити, що транслокація 1RS.1BL значно знижує показники хлібо-

пекарської якості, тоді як присутність 1RS.1AL не призводить до такого різкого зниження цих показників у твердозерних форм пшениці [2, 4]. Для прискорення селекційного процесу необхідне використання сучасних біотехнологічних методів, зокрема, отримання гомозиготних ліній шляхом гаплоїдії. Одним із яких є культура ізольованих пиляків [4]. Отже, робота з тестування гаплопродукційної здатності озимої м'якої пшениці та отримання серед регенерантів подвоєних гаплоїдів, які містять транслокації 1RS.1BL та 1RS.1AL, є актуальною та важливою.

#### Матеріали і методи

Дослідницький матеріал наданий відділом селекції та насінництва пшениці СГІ-НЦНС. У роботу було залучено 16 гібридних популяції F<sub>1</sub> та 9 батьківських сортів. Сорти Золотоколоса, Княгиня Ольга, що містять транслокацію 1RS.1AL, і сорти Легенда Миронівська, Калинова, Колос Миронівщини – транслокацію 1RS.1BL, були залучені в схрещування с сортами місцевої селекції – Годувальниця Одеська, Дальницька, Куяльник, Антонівка, що характеризуються, як високоадаптивні до кліматичних умов Півдня України. Також досліджували 11 складних гібридів від схрещувань із трансгресивними лініями: Tr-1, Tr-3, Tr-4, Tr-5, що містять 1RS.1BL транс локацію.

Рослини вирощували в 2012 р. на дослідних польових ділянках СГІ-НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній фазі розвитку. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3-5 діб при +2 – +4 °C у

темряві [4, 5]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [6]. Ізольовані пиляки висаджували на індукційне поживне середовище 190-2 [6] у модифікації [7]. Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури +30 °C, далі при + 24 °C до появи новоутворень. Сформовані калюсні макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації [7] і культивували у темряві 3–4 тижні до появи центрів регенерації, далі – за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 10 тис. люкс, температурі + 24 °C до формування рослин-регенерантів. Зелені рослини пересаджували на безгормональне поживне середовище MS та яровизували 45 діб за температури +2-4 °C, 16-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 3000–3500 люкс. Потім отримані рослини-регенеранти висаджували у ґрунтову суміш у маленькі 200 мл пластикові стакани, накривали агроволокном (для кращої адаптації до