

УДК 577.2; 632.938; 581.2

**ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ISR
У РАСТЕНИЙ ТОМАТА МЕТОДОМ ПЦР**

Ю. Ю. Павловец¹, О. В. Лагодич²

^{1,2}Белорусский государственный университет, пр-т Независимости, д.4, г.Минск, 220030, Беларусь

Активировать индуцированную системную устойчивость (ISR) можно с помощью ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* их метаболитов – сидерофоров, феназиновых антибиотиков, полисахаридов и др., которые служат индуцирующими агентами (элисителями) [1]. В ответ на воздействие биогенных элисителей, в растительных клетках запускается система распознавания этих элисителей и формирования ISR. Происходит быстрое и интенсивное накопление так называемых стрессовых фитогормонов (ABA, ET, JA (и MeJA), системин и др.), которые вызывают синтез различных защитных соединений и повышают устойчивость растений [2]. Установлено повышение содержания мРНК, кодирующих различные формы липоксигеназ (LOX). LOX являются ключевыми ферментами растений, участвующими в образовании производных окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – оксипинолов [3]. Высокая физиологическая активность оксипинолов обусловлена их ролью в качестве сигнальных молекул в регуляции процессов роста, развития и старения организмов [4], а также в механизмах формирования защитных реакций клеток растений [5].

В настоящей работе проводится анализ подбора праймеров для изучения экспрессии генов LOX, выбранных на роль маркеров ISR у растений томата.

Растения томата сорта «Перемога 165» обрабатывали культуральной жидкостью бактерий *P. aurantiaca* B-162, *P. putida* КМБУ 4308, а также их мутантными штаммами *P. aurantiaca* phz⁻ и *P. putida* pvd⁻, не способными к синтезу феназиновых антибиотиков и пиовердина, соответственно. Спустя 3 недели после посадки проводили заражение рассады спорами фитопатогенного гриба рода *Botrytis cinerea* Pers. Фрагменты листьев томата для выделения РНК отбирали через 1, 2, 7 суток после заражения, помещали в эппендорфы и быстро замораживали в жидком азоте, кДНК готовили с помощью обратной транскриптазы M-MLV (Thermo Scientific) по протоколу изготовителя фермента.

У томата обнаружено пять изоформ липоксигеназ – LoxA, LoxB, LoxC, LoxD и LoxE, которые экспрессируются в различных частях растения. Нами был выбран ген LoxD, экспрессия которого обнаружена в листьях томатов. В качестве референсного гена был выбран *EF-1α*, кодирующий субъединицу фактора элонгации трансляции. Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо было подобрать праймеры, использовали базу данных NCBI. Для подбора праймеров использовали программу OligoCalc. Для гена LoxD было написано две пары праймеров, прямой праймер был написан на границе экзона и интрона (табл.). Для постановки ПЦР использовали следующую программу: 95°C – 3 мин; 95°C – 15 сек, 52°C – 1 мин (40 циклов); 72°C – 4 мин; 4°C – ∞.

На электрофорефорезе после проведения ПЦР наблюдалась следующая картина: были четко видны продукты амплификации к референсному гену *Ef1-α*, с первой парой праймеров LoxD не удалось получить продукт, со второй парой праймеров LoxD наблюдалось несколько фрагментов амплификации разной длины, среди которых был продукт нужной длины (163 п.о.). Для оптимизации условий проведения ПЦР было изменено время отжига праймеров: при 15 и 30 сек продукт амплификации LoxD

получить не удалось, при 45 сек продукт амплификации нужной длины был более четко виден, чем при 1 мин.

Таблица

Праймеры для липоксигеназ и референсного гена

Название	Последовательность 5' – 3'	Длина продукта п.о.	Код доступа
Ef1- α F	TTGAGGCTCTTGACCAGATTAATG	121	BT013246
Ef1- α R	GTTTCAACACGACCGACAGG		
1-ая пара праймеров			
LoxD F	GACTGTTCAAGAGGCTTTGG	150	NC_015438. 2
LoxD R	GTGTGCCAACATCAGACAAG		
2-ая пара праймеров			
LoxD F	ACGAACAAGCACCAGCAGG	163	NC_015440. 2
LoxD R	TGCTGGTGTTCATCCGGTAAA		

Таким образом, был проведен анализ подбора праймеров и условий их функционирования для постановки ПЦР. В результате было показано, по качеству полученных продуктов наиболее удачными является вторая пара праймеров LoxD с временем отжига 45 секунд.

Литература

1. Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам/ В.Д. Поликсенова // Вестник БГУ. – 2009. – Сер. 2, – №.1. – С. 48-58.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский // Наука. – 2002. – 294 с.
3. Mosblech A. Oxylipins structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation / Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – Vol.47(6) – P.511-517.
4. Chechetkin I. R. Oxidation of glycerolipids by maize 9-lipoxygenase and its A562G mutan. / Chechetkin I. R., Osipova E. V., Antsygina L. L., Gogolev Y. V., Grechkin A. N.// Chem. Physics Lipids. – 2011. – Vol.164(3) – P.216-220.
5. Grebner W. Lipoxygenase 6–dependent oxylin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of Arabidopsis /Grebner W., Stingl N. E., Oenel A., Mueller M.J., Berger S.//Plant Physiol. – 2013.–161(4) –P.2159-2170.