

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЭЛИСИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ У *SOLANUM LYCOPERSICUM* L

А. В. Зуева

Белорусский государственный университет, г. Минск;

alik.zev@gmail.com;

науч. рук. – О.В. Лагодич, ст. преп.

Было установлено, что обработка семян томатов экзогенными элиситорами (Янтарин и Эпином), увеличивает активность гена фенилаланин-аммиак-лиаза, тем самым индуцируя неспецифическую устойчивость растений к стрессорам.

Ключевые слова: экзогенные элиситоры, фенилаланин-аммиак-лиаза, томат.

На сегодняшний день, устойчивость растений, в частности, сельскохозяйственных культур, к биотическим и абиотическим стрессовым воздействиям, является одним из основных критериев при выборе конкретного сорта из множества аналогичных в целях выращивания и получения урожая. Одно из перспективных направлений молекулярной биологии, позволяющее значительно повысить эффективность сельского хозяйства состоит в изучении различных форм системной устойчивости растений, и механизмов ее индукции. Фенилаланин-аммиак-лиаза – ключевой фермент фенилпропаноидного биосинтеза, который участвует в синтезе соединений, играющих важнейшую роль в индуцировании неспецифической устойчивости растений к стрессорам. Фермент обратимо катализирует реакцию дезаминирования L-фенилаланина с образованием транс-коричной кислоты и аммиака. С этой реакции начинается синтез широкого спектра вторичных метаболитов: фенолов, фенилпропаноидов, мономеров лигнина, салициловой кислоты и других соединений, необходимых для развития растений и защиты их от неблагоприятных факторов [1,2,3].

В связи с этим изучение влияния экзогенных элиситоров на активность гена фенилаланин-аммиак-лиазы у *Solanum lycopersicum* L. является актуальным.

В работе использовали Эпин (эпибрассинолид 0,25 г/л) – регулятор роста и развития растений и регулятором роста растений на основе янтарной кислоты Янтарин.

Объектом исследования служили томаты сорта «Доходный» белорусской селекции. Семена перед посевом подвергались поверхностной стерилизации в слабом растворе перманганата калия (10 мин) и 70%-ном растворе этилового спирта в течение 5 минут и

промывались стерильной дистиллированной водой 3 раза и далее помещались в раствор Эпина и Янтарина на 30 минут.

Семена проращивали в культуре *in vitro* на безгормональной среде Мурасиге-Скуга, содержащей стандартный набор солей [4]. Растения культивировали в климатической камере при 16-ти часовом освещении и температуре 18°C(ночь) – 24°C(день). На стадии четырех настоящих листьев (четыре-пять недель после прорастания), на первый настоящий лист наносили суспензию спор фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* Pers, которые получали путем смыва с чашки с трехнедельным спороносящим мицелием.

На седьмые сутки после заражения отбирали фрагменты листьев томата, помещали в эппендорфы и быстро замораживали в жидком азоте, хранили при – 70°C. Выделение РНК из отобранных образцов проводилось посредством хлороформ-фенольного метода [5]. С полученной РНК проводилась реакция обратной транскрипции с использованием рандомных гексамеров.

Для амплификации фрагмента гена фенилаланин-аммиак-лиазы использовали праймеры, последовательности которых представлены в таблице 1. При этом, сконструированы они были таким образом, что прямой праймер в незрелой РНК разделен интроном. Такая структура праймеров для ПЦР позволяет исключить ошибки сплайсинга. В качестве референсного гена использовали EF1 α , кодирующего субъединицу фактора элонгации и трансляции (табл.).

Олигонуклеотиды

Ген	Последовательность 5'- 3'	Размер
Pal5 F	CTTATCAGGTTCTTGAATGCTGG	23
Pal5 R	GGGGTAATGTTGCTGTTGATC	21
Ожидаемый продукт амплификации гена Pal5 182 п.н.		
Ef1- α F	TTGAGGCTCTTGACCAGATTAATG	24
Ef1- α R	GTTTCAACACGACCGACAGG	20
Ожидаемый продукт амплификации гена Ef1- α 121 п.н.		

С использованием данных праймеров была проведена серия экспериментов по постановке ПЦР, в ходе которой нами были подобраны оптимальные условия для амплификации и наиболее подходящие концентрации реагентов.

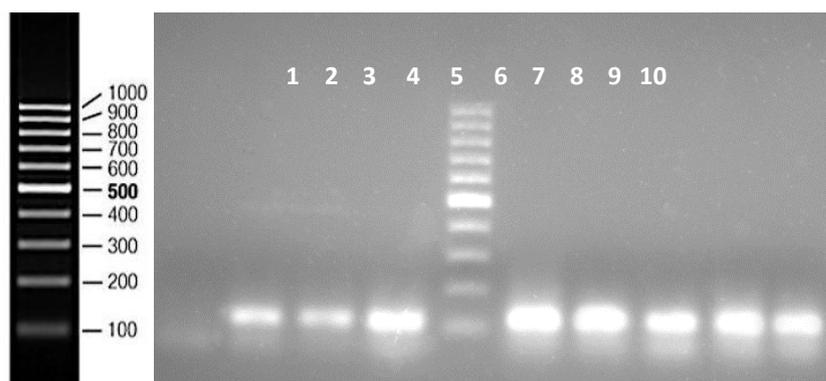


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена EF1 α

- 1 – отрицательный контроль
- 2 - контрольное растение, зараженное *B. cinerea*;
- 3 - контрольное растение;
- 4,6– эксперим. растение, обработанное Янтарином и зараженные *B. cinerea*;
- 5 – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific);
- 7 – эксперим. растение, обработанное Янтарином;
- 8-9 – эксперим. растения, обработанные Эпином и зараженные *B. cinerea*;
- 10 – эксперим. растение, обработанное Эпином;

На первом этапе исследования провели полимеразную цепную реакцию для получения продукта амплификации гомеостатического гена EF-1 α , который экспрессируется в растениях постоянно. В результате серии экспериментов нам удалось получить продукт ожидаемой длины во всех образцах растительного материала, что позволяет использовать его в качестве референсного ген.

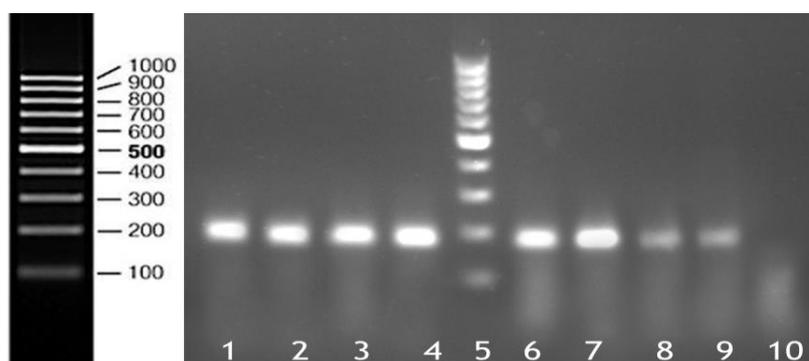


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена Pal5

- 1 – эксперим. растение, обработанное Эпином;
- 2-3 – эксперим. растения, обработанные Эпином и зараженные *V.cinerea*;
- 4 – эксперим. растение, обработанное Янтаринном;
- 5 – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific);
- 6-7 – эксперим. растения, обработанные Янтаринном и зараженные *V.cinerea*;
- 8 - контрольное растение;
- 9 – контрольное растение, зараженное *V.cinerea*;
- 10 - отрицательный контроль

В результате проведения ПЦР с помощью электрофоретического анализа показано, что во всех образцах листьев томата присутствуют фрагменты гена Pal5, экспрессирующегося при системной устойчивости. Основываясь на подходах «полуколичественных методов анализа» можно заключить, что экспрессия Pal5-гена в экспериментальных образцах выше, чем в контрольных.

Таким образом полученные результаты подтверждают влияние таких элиситоров как Янтарин и Эпин на экспрессию гена Pal5, и, как следствие на активацию неспецифической системной устойчивости растений томата.

Библиографические ссылки

1. Васюкова Н.И., Придворова С.М., Герасимова Н.Г. Участие фенилаланинаммиаклиазы и салициловой кислоты в индуцировании устойчивости томатов, инвазированных галловой нематодой *M. Incognita* // Доклады академии наук– 2007.– 416, №6. – С.826–829.
2. Герасимова И.Г., Придворова С.М., Озерецковская О.Л. Участие фенилаланинаммиак-лиазы в индуцированной устойчивости и восприимчивости картофеля // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005.– 41, №1. – С.117–120.
3. Gayoso et al.: The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. BMC Plant Biology 2010 10:232.
4. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiologia Plantarum, 1962, – Vol.15, – № 3: 473–497.
5. Присяжненко О.К., Николайчик Е.А., Евтушенко А.Н. Экспрессия гена харпина HRPN *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica* в растениях табака индуцирует гены устойчивости// Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51. № 5. Р. 85.