

сельскохозяйственной академии: монография. М.: Наука, 2020. – 382 с.

2. Лебедев А.В. Динамика продуктивности и средообразующих свойств древостоев в условиях городской среды: на примере Лесной опытной дачи Тимирязевской академии: дис... канд. с.-х. наук. - Москва, 2019. - 234 с.

3. Лебедев А.В., Кузьмичев В.В. Регрессионные модели смешанных эффектов в лесохозяйственных исследованиях // Сибирский лесной журнал. 2021. № 1.

4. Усольцев В.А. Фитомасса модельных деревьев для дистанционного зондирования и наземной таксации лесов Евразии: монография / В.А. Усольцев. – 2-е изд., доп. – Екатеринбург: Уральский государственный лесотехнический университет; Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, 2020.

УДК 630*165.3

Л. В. Можаровская, науч. сотр.;
С. В. Пантелеев, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.;
О. Ю. Баранов, д-р биол. наук, зав. лаб.
(Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель)

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИОННОМУ ПОЛЕГАНИЮ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Лесовосстановительные мероприятия с использованием семян древесных растений, характеризующихся повышенной устойчивостью к инфекционным болезням, лежат в основе формирования устойчивых и высокопродуктивных насаждений. Одним из инструментов отбора устойчивых генотипов деревьев является применение молекулярно-генетического подхода с количественной оценкой экспрессионной активности генов конститутивной и индуцированной защиты.

Проведенные ранее нами исследования, на основе анализа данных транскриптома проростков сосны обыкновенной в условиях заражения *Fusarium* sp. – возбудителя инфекционного полегания семян, позволили идентифицировать перечень конститутивных и патоген-индуцированных генов, детерминирующих защитные механизмы на стадии проростков [1]. Среди 150 кодирующих последовательностей, характеризующихся наибольшим уровнем экспрессии, был выявлен обширный спектр EST-локусов, детерминирующих структурные и функциональные полипептиды

(SS/AF, AMP, DEF (PR-12), GH19, LEA, DHN, CBP, PSACRE, HSP70, HSP90, HSP40S, белки PR-4 и PR-10, пероксидазы (PR-9), тауматин и противогрибковые тауматин-подобные белки (PR-5), лейцин-насыщенные рецепторподобные протеинкиназы (LRR-RLK), глицин-насыщенные РНК-связывающие белки), вовлеченные в механизмы защиты растений [1]. Для данных локусов был разработан набор маркеров и сформирован комплект праймеров [2]. Позднее в работе [3] были выявлены EST-локусы гена PR-1 не характеризующиеся наибольшим уровнем экспрессии в общей сумме транскриптов, но проявившие индуцированный характер экспрессионной активности: отмечено увеличение числа транскриптов, относительно прочтений на миллион, в 49,5 раз в сравнении с аналогичными транскриптами транскриптома проростков, выращенных вне инфекционного фона.

Исходя из дополнительно полученных данных, целью данной работы явилось проведение оптимизации комплекта маркеров для диагностики устойчивых генотипов сосны обыкновенной к возбудителям инфекционного полегания и формирование набора праймеров.

Дизайн праймеров проводился в онлайн сервисе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). При конструировании праймеров придерживались следующих характеристик: температура плавления праймеров – 63-66 °С; различия в температурах плавления праймеров – 3 °С; максимальное количество GC-нуклеотидов на 3'-конце праймера – 2; GC-состав праймеров – 40-65%; наибольшее количество G-повторов – 3; длина праймера – 18-25 нуклеотидов; максимальная комплиментарность – 8; максимальная комплиментарность 3'-конца – 3; максимальная длина мононуклеотидных повторов – 5. Амплифицированные фрагменты включают основную часть функционального домена, кодируемого исследуемым локусом, и составляет 250-650 п.н., что позволяет оценивать также и их генетический полиморфизм. Полученный набор праймеров для количественной оценки экспрессии локусов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционному полеганию семян сосны обыкновенной, представлен в таблице.

Таблица – Набор праймеров для количественной оценки экспрессии локусов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционному полеганию семян сосны обыкновенной

| Локус | Нуклеотидная структура праймера, F | Нуклеотидная структура праймера, R | Размер амплифицируемого фрагмента, п.н. |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| PR-1 | TTACGAGCATCGTCAACGTACA | AGGGCAAGGGCAAGATGTG | 535 |
| PR-3 | GCCATGGACATCTTTGGCAT | CGACGACCAGAAGAGAGAGC | 525 |
| PR-4 | TGGCTATAGGACATCAGCCCT | CAGCAAGCGTCCAATGTGAG | 433 |

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------|------------------------|-------------------------|-----|
| PR-5 | TGCTATCCAGAACCAGTGTTC | ATGGCATCATCAAGGGCAGAA | 616 |
| PR-9 | GGGAATTAACGCTGCTTGCTT | CACCACCGGTACACAAATGC | 463 |
| PR-10 | TCGGGTCACAGTAGAGTTGAAG | ACGAAGACAGATGCGCATAGA | 536 |
| PR-12 | TTGTGCTGCTCGTCGTAAGC | TGCCGATATGGTATTAGCGGTT | 274 |
| SS/AF | GTAGGCACTCCCAACACAAAC | TTGGGGTGCAGACGTTGAGTA | 353 |
| AMP1 | CGGCCTTCTGAGGGCAGTTAT | TAGATGATGCCACGCCATGAA | 377 |
| LEA3 | AGTCGCATGAACGGTGAGG | GTGGTCCATTCCCACACTACCTA | 495 |
| DHN | GGAGAAGAAAGCAGGTGTCA | TCCCATCAATGCTCTCAGGC | 348 |
| CBP | GCCCGTTTCGATCCGACTAT | ACAAAAGAGGGCATCCTCCG | 606 |
| PsACRE | GGCAACTCCAAGATGGCTAA | AACGATCTGCCAGTTCTCCA | 287 |
| Hsp70 | AGCATCAGCACCTGGAAATC | AGGCTGAGGATGAAGAGCTG | 296 |
| Hsp90 | CCTCCATTTTGCTGCCCTCT | AGAGGGCTGAAGCAGACAA | 237 |
| Hsp40s | CGAATTCGTTCTTGAGAGGCAA | CCCATCAGGCCATCCATATAGT | 319 |
| LRR-RLK | ACGTCTGGGCGTTTGAATC | TGCTCCCGTGAGCCTATTG | 589 |

Исследование частично финансировано БРФФИ
в рамках научного проекта № Б20М-015

ЛИТЕРАТУРА

1. Можаровская Л. В., Пантелеев С. В., Баранов О. Ю., Падутов В. Е. Идентификация и функциональная аннотация патоген-индуцированных генов проростков сосны обыкновенной // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч.тр. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2019. – Т.26. – С. 69–78.
2. Можаровская Л. В., Пантелеев С. В., Баранов О. Ю. Разработка набора маркеров для диагностики устойчивых к болезням генотипов сосны обыкновенной (на примере инфекционного полегания семян) // Лесное хозяйство: материалы 84-й науч.-техн. конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием), Минск, 03–14 февраля 2020 г. / отв. за издание И. В. Войтов; УО БГТУ. – Минск: БГТУ, 2020. – С. 74.
3. Можаровская Л. В., Баранов О. Ю. Идентификация и анализ экспрессионной активности PR-генов проростков сосны обыкновенной в присутствии микромицетов рода *Fusarium* // Лесные экосистемы: современные вызовы, состояние, продуктивность и устойчивость: Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию Института леса НАН Беларуси (Гомель, 13–15 ноября 2020 г.) – Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2020 – С.176-179.