



DOI: 10.21178/2079-6080.2025.4.90
УДК 582.475:632.4:577.21

Оценка иммунного ответа различных по урожайности генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) при заражении грибными патогенами

© Е.И. Трапезникова, Т.А. Гродецкая, А.М. Кондратьева, О.А. Федорова,
П.М. Евлаков

Evaluation of the immune response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) genotypes with different yields when infected with fungal pathogens

E.I. Trapeznikova, T.A. Grodetzkaya, A.M. Kondratyeva, O.A. Fedorova, P.M. Evlakov (Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozov)

An analysis of the immune response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) genotypes with different yields to infection with the fungal pathogens *Fusarium oxysporum* Schltdl. and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. was conducted. The relevance of the study is determined by the need to identify resistant genotypes for breeding programs and forest protection, especially in the context of the weakening of plants by abiotic factors, which increases their vulnerability to phytopathogens. The objects of the study were one-year-old seedlings of high-, medium-, and low-yielding pine, as well as a population collection as a control. Infection was carried out by injection into the root collar. The aim of the study was to identify genotypes with the most effective defense strategy by assessing the expression of genes encoding pathogenesis-related proteins PR1 and PR10. Significant differences in the immune response were identified between the genotypes. The high-yielding pine showed a weak and delayed response to both pathogens, indicating its low natural resistance. The low-yielding genotype demonstrated rapid but excessive and unstable activation of the *PR1*-gene, particularly in response to *F. oxysporum*, which may lead to inefficient resource use. The most balanced and powerful immune response was observed in the medium-yielding pine, which effectively activated both genes, particularly *PR10*, in response to *H. annosum*. The medium-yielding pine genotype has been identified as promising for breeding for resistance to phytopathogen infestation, while the high-yielding form is not recommended for planting in phytopathogen hotspots.

Key words: сосна обыкновенная, грибные патогены, Fusarium wilt, annosus root rot, иммунитет, *PR1*, *PR10*, gene expression, antimicrobial proteins, AMP

Оценка иммунного ответа различных по урожайности генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) при заражении грибными патогенами

Е.И. Трапезникова, Т.А. Гродецкая, А.М. Кондратьева, О.А. Федорова, П.М. Евлаков

Проведен анализ иммунного ответа различных по урожайности генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на заражение грибными патогенами *Fusarium oxysporum* Schltdl. и *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Актуальность работы обусловлена необходимостью выявления устойчивых генотипов для селекционных программ и защиты лесов, особенно в контексте ослабления растений абиотическими факторами, что повышает их уязвимость к фитопатогенам. Объектами исследования были выбраны однолетние сеянцы высоко-, средне- и низкоурожайной сосны, а также популяционный сбор в качестве контроля. Заражение проводили путём инъекции споровой суспензии патогенов в корневую шейку. Целью работы было выявление генотипов с наиболее эффективной стратегией защиты путем оценки экспрессии генов патогенез-родственных белков *PR1* и *PR10*. Установлены существенные различия в иммунном ответе между генотипами сосны. Высокоурожайная сосна показала слабую и запаздывающую реакцию на оба патогена, что свидетельствует о ее низкой естественной устойчивости. Низкоурожайный генотип продемонстрировал быструю, но чрезмерную и нестабильную активацию гена *PR1*, особенно в ответ на *F. oxysporum*, что может приводить к неэффективному расходованию ресурсов растений. Наиболее сбалансированный и мощный иммунный ответ отмечен у среднеурожайной сосны, которая эффективно активировала оба гена, особенно *PR10*, в ответ на инокуляцию *H. annosum*. Среднеурожайный генотип сосны идентифицирован как перспективный для селекции на устойчивость к заражению фузариумом и корневой губкой, в то время как высокоурожайная форма не рекомендуется для посадки в очагах исследованных фитопатогенов.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, грибные патогены, фузариоз, корневая губка, иммунитет, *PR1*, *PR10*, экспрессия генов, антимикробные белки, AMP

Трапезникова Екатерина Игоревна – инженер лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК
E-mail: katena.trapeznikova.02@mail.ru

Гродецкая Татьяна Александровна – научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК, канд. биол. наук
E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

Кондратьева Анна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК, канд. биол. наук
E-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Федорова Ольга Анатольевна – старший научный сотрудник, канд. биол. наук
E-mail: fed-olga78@mail.ru

Евлаков Петр Михайлович – заведующий лабораторией анализа ПЦР НИИ ИТЛК, канд. биол. наук
E-mail: peter.evlakov@yandex.ru

ФГБОУВО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова»
394087, Воронеж, ул. Тимирязева, д. 8
Телефон: +7(473) 253–72–90
E-mail: lesteh@vglta.vrn.ru

Введение

Ослабленные абиотическими факторами растения чаще подвержены заражению фитопатогенами. Наиболее опасными среди них для растений, в том числе древесных, считаются грибы. В десятку самых вредоносных экономически значимых патогенов вошли *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* и *Colletotrichum*, паразитирующих на широком спектре видов растений [11]. Для противостояния патогенным грибам растения используют различные иммунные стратегии, начиная с распознавания микроорганизма, активации сигнальных путей защиты и выработки противогрибковых соединений, таких как белки PR [9, 22]. Исследования транскрипции показали повышение экспрессии генов PR после грибковых инфекций, в том числе в неинфицированных органах, что подтверждает их роль в устойчивости к болезням за счет активации системной приобретенной устойчивости (systemic acquired resistance, SAR) [5, 20]. Белки PR являются мишенями для создания устойчивых к широкому спектру заболеваний сортов [6, 24]. Исследования показали, что белки PR гидролизуют клеточную стенку грибов, что приводит к гибели клетки. Наиболее высокую устойчивость к грибным инфекциям показывают белки PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-12 [7, 16, 23, 27].

Спектр действия антимикробных белков (Antimicrobial peptides and proteins, AMPs) достаточно широк [10]. Гидролазы, например, хитиназы (PR-3) и глюканазы (PR-2), и белки PR-4 нарушают структурную целостность клеточной стенки грибов и тем самым влияют на их рост. Тионины (PR-13), 2S-альбумины, белки переноса липидов (PR-14) и пуриноиды оказывают воздействие на фосфолипидный бислой плазматической мембраны патогенов, лизируя фосфолипидные везикулы. Белки типа PR-5 и растительные дефензины (PR-12) косвенно влияют на рецепторы плазматической мембраны [10, 12]. Сверхэкспрессия отдельных генов PR (хитиназы, глюканазы, тауматины, дефензины и тионины), так

же, как и их различные комбинации, приводит к повышению уровня защитного отклика растений-хозяев в ответ на действие патогенов [7]. PR-8 характеризуются лизоцимной активностью [26]. Некоторые глюканазы и хитиназы обладают противогрибковыми свойствами по отношению к определенным видам грибов [18]. PR-6 являются ингибиторами протеиназ и участвуют в защите от насекомых, микроорганизмов и нематод [17, 21]. PR-7 в томате является вспомогательным средством для противогрибкового действия и выступает как эндопротеиназа, расщепляя белки клеточной стенки грибов в дополнение к гидролизу хитина и глюкана [14, 15]. Семейство пероксидаз PR-9 в ответ на микробную атаку катализирует отложение лигнина и участвует в укреплении клеточных стенок растений [26]. Картофельный PR-5 вместе с основной хитиназой связывает актин и вовлекается в защиту картофельной клетки от *Phytophthora infestans* [25]. Инфекция вирусом курчавости репы или обработка салициловой кислотой индуцировали синтез PR-5 [28]. Семейство PR-10 структурно связано с рибонуклеазами [19]. Дефензины типа PR-12, тионины типа PR-13 и LTP типа PR-14 проявляют противогрибковую и антибактериальную активность, оказывая свое действие на уровне плазматической мембраны патогенного микроорганизма [8, 10, 13].

Для многих различных типов антимикробных белков был доказан синергетический эффект: в тканях растений одновременно экспрессируется ряд генов AMP. В неинфицированных вегетативных тканях растений экспрессия генов выше в воротах микробных инфекций (эпидермальные клетки, устьица, гидатоды, клетки в сосудистых тяжах) [10]. В инфицированных патогенами вегетативных тканях происходит скоординированная активации наборов генов антимикробных белков через множественные сигнальные пути. Антимикробные белки откладываются во внеклеточном пространстве или хранятся в вакуолях, высвобождаясь при лизисе клетки.

Вакуолярные и внеклеточные изоформы AMP обычно являются продуктами разных генов [10].

Абиотические и биотические факторы не действуют изолированно, поэтому изучение роста и продуктивности древесных растений требует комплексного подхода. Понимание реакции растений на заражение фитопатогенами имеет решающее значение для разработки стратегий повышения устойчивости.

Целью исследования было выявление генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с наиболее эффективной и устойчивой стратегией защиты путем анализа экспрессии генов патогенез-родственных белков

PR1 и PR10 для оценки иммунного ответа различных по урожайности генотипов при заражении грибными патогенами (*Fusarium oxysporum* и *Heterobasidion annosum*).

Объекты и методы исследования

В эксперименте по воздействию заражения фитопатогенами использовали однолетние сеянцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (табл. 1). Семенной материал для посева был отобран на селекционных по признаку урожайности культурах сосны обыкновенной, заложенных на лесосеменной плантации № 68 Семилукского лесопитомника, автор Ю.П. Ефимов.

Таблица 1

Характеристика генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)

№ п/п	Наименование генотипа сосны	Инв. номер	Происхождение	Автор гибрида
9	Высокоурожайная	130	<i>P. sylvestris</i> L.	Ю.П. Ефимов
10	Среднеурожайная	60		
		4		
11	Низкоурожайная	22		
		23		
12	Популяционный сбор	контроль		

Для создания искусственного инфекционного фона *Fusarium oxysporum* (коллекция фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИ фитопатологии) выращивали на жидкой среде Чапека (на 1 л дистиллированной воды: сахара — 30 г, натрий азотнокислый (NaNO_3) — 2 г, калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) — 1 г, магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) — 0,5 г, калий хлористый (KCl) — 0,5 г, железо сернокислое закисное ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) — 0,01 г). при 26–28 °C на шейкер-инкубаторе (150 об/мин) в течение недели. Для получения инфекционного материала возбудителя корневой губки *Heterobasidion annosum* (коллекция ВКПМ F-471) в качестве питательной среды использовали мальт-пептонную среду (на 1 л дистиллированной воды: мальт-экстракт —

30,0 г, пептон — 1,0 г). Колбы с засеянной фитопатогеном питательной средой инкубировали при 24–26 °C на шейкер-инкубаторе (150 об/мин) в течение недели. Полученные после культивирования суспензии фитопатогенов доводили до титра 2×10^6 спор/мл и использовали для инокуляции растений.

Для успешного заражения растений большее значение имеет жизнеспособность инфекционного материала. Этот показатель оценивали по прорастанию конидиоспор патогена. Споровую суспензию наносили каплями на предметные стекла и помещали их в чашки Петри для создания условий влажной камеры. Чашки ставили в термостат, где поддерживали температуру 26–28 °C. Число проросших спор подсчитывали через 6–8 часов в поле зрения микроскопа не менее чем в 10 каплях. Пророс-

шими считали споры, у которых длина ростовых трубок превышали длину спор. Для заражения растений использовали инфекционный материал, в котором жизнеспособность спор составляла не менее 80 % [2].

Заражение растений сосны проводили методом инъекции суспензии патогена в корневую шейку растений. На место укола наносили сверху тонкий слой медицинского клея БФ-6, чтобы предотвратить высыхание растительных тканей.

Отбор образцов растительных тканей проводили в момент заражения, а также на 3-и и 5-е сутки после заражения.

Молекулярно-генетические показатели определяли у растений сосны обыкновенной на основании анализа 5 растений для каждого варианта. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета MS Excel 2019.

Для исследования образцов различных генотипов сосны проведено выделение РНК, обратная транскрипция и оптимизация гибридации праймеров на матрицу кДНК и протокола проведения ПЦР.

Для выделения РНК была использована модифицированная методика с применением СТАВ-буфера для гомогенизации, который предварительно прогревали до 65 °С на водяной бане. Навеску исследуемого образца весом 25 мг гомогенизировали в соотношении 1:10 с использованием ступки и пестика в среде выделения (2 % PVP, 100 мМ TrisHCl (рН 8,0), 20 мМ ЭДТА, 1,4 М NaCl). Инкубацию проводили в твердотельном термостате при 65 °С в течение 1 часа, периодически перемешивая. В остывшие пробы вносили равный объем хлороформа и перемешивали 30 сек, центрифугировали 10000 об/мин 5 мин. Надосадок отбирали в новую пробирку, добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1), центрифугировали при тех же условиях. Верхнюю фазу раствора переносили в новую пробирку, добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), центрифугировали при тех же параме-

трах. Надосадок переносили в новую пробирку и добавляли третью часть объема 12 М LiCl. Образцы инкубировали при –20 °С в течение 30 минут, после чего центрифугировали при 13000 об/мин 15 минут в условиях пониженной температуры (4 °С). Надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 500 мкл 96 % этанола. Центрифугировали 10 минут при 10000 об/мин в условиях 4 °С. Далее спирт удаляли, добавляли 70 % этанол, центрифугировали пробы при тех же условиях. Просушивали пробы под вытяжкой до полного испарения влаги и растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Образцы хранили при –80 °С до дальнейшего использования.

Качественную оценку РНК проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя этидия бромид. Визуализацию полученного результата проводили с использованием геледокументирующей системы Vilber Lourmat (Франция).

Концентрацию РНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США), используя стандартные реактивы производителя. РНК в количестве 0,5 мкг отбирали для проведения обратной транскрипции с применением набора АмплиСенс (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Подбор праймеров к генам устойчивости сосны из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) проводили с использованием программы Primer3 (Министерство образования и исследований Эстонии и Центр передового опыта в области геномики и трансляционной медицины Тартуского университета, Эстония). Перечень праймеров для анализа экспрессии генов устойчивости сосны к заражению фитопатогенами представлен в таблице 2.

Для оптимизации температуры отжига праймеров на матрицу кДНК использовали следующий протокол проведения ПЦР: первичную денатурацию ДНК и праймеров (95 °С, 3 мин),

40 циклов из стадий, включающих денатурацию (95 °С, 30 с), отжиг (гибридизацию) праймеров (60 °С, 30 с) и элонгацию (72 °С, 30 с), и 1 цикл финальной элонгации 2 мин (72 °С).

Таблица 2

Последовательности праймеров к генам стрессоустойчивости сосны

Ген	Последовательность (5'→3')
<i>psGAPDH</i>	F: GGACAGTGGGAAGCATCAT
	R: AACCGAATACAGCAACAGA
<i>psPRI</i>	F: TGCCCCTTCAGGTAATCGT
	R: GCGGGTCGTAGTTGCAGATAA
<i>psPR10</i>	F: TGTCTCAAGTGGAGGCAAGGA
	R: AAGCGACAATTCAGGCAAAAC

Специфичность амплификации праймеров оценивали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Оценку экспрессии проводили с помощью амплификатора Roche Light Cycler 480 II (Roche, Швейцария). Для постановки количественной ПЦР использовали стандартный набор 5x qPCR–HS SYBR (Евроген, Россия), содержащий в качестве интеркалирующего красителя SYBR Green. В качестве референсного гена для сосны использовали *GAPDH*. Расчет полученных результатов проводили $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методом (Livak and Schmittgen, 2001) с использованием программного обеспечения Light Cycler (Roche, Швейцария) и программного пакета MS Excel.

Результаты и их обсуждение

Инфекционный фон — это усиленная инфекционная нагрузка, созданная с целью оценки устойчивости растения к заболеванию. В зависимости от способа его создания различают естественный и искусственный фоны [4]. При искусственном заражении необходимое количество инфекционного материала (инокулюма), предварительно инкубированного в лабораторных условиях, вносят в почву или непосредственно на растение. Существует несколько способов заражения, которые подбираются в зависимости от биологических особенностей патогена и растения.

Грибы рода *Fusarium*, вызывающие серьезные поражения хвойных пород деревьев, распространяются в проводящих тканях дерева, приводя к закупорке проводящих сосудов и некрозу [1]. Корневая губка (*Heterobasidion annosum*) способствует загниванию корней и последующее отмирание заражённых деревьев [3].

Направленное введение патогенов методом укола позволяет инокулировать болезнетворными микроорганизмами растения непосредственно в активные сосудистые ткани (ксилему) дерева, минуя естественные барьеры коры и наружных тканей. Это обеспечивает быстрое, контролируемое и локализованное заражение исследуемого растения, что делает данный способ идеальным для экспериментального изучения биологии болезни и взаимодействий с растением. Кроме того, инъекция уколком имитирует естественные пути проникновения инфекции в древесину через раны или механические повреждения, что позволяет изучать процессы болезни в условиях, близких к природным.

В результате проведенного исследования получены данные об уровне относительной экспрессии генов *PR1* и *PR10*.

При заражении фузариумом наблюдается незначительный рост экспрессии гена *PR1* у высокоурожайной сосны на 3-й день (10 %), который полностью исчезает к 5-му дню

(рис. 1). Иммунный ответ при этом не формируется. Растение не воспринимает атаку как серьезную угрозу или патоген успешно ее подавляет.

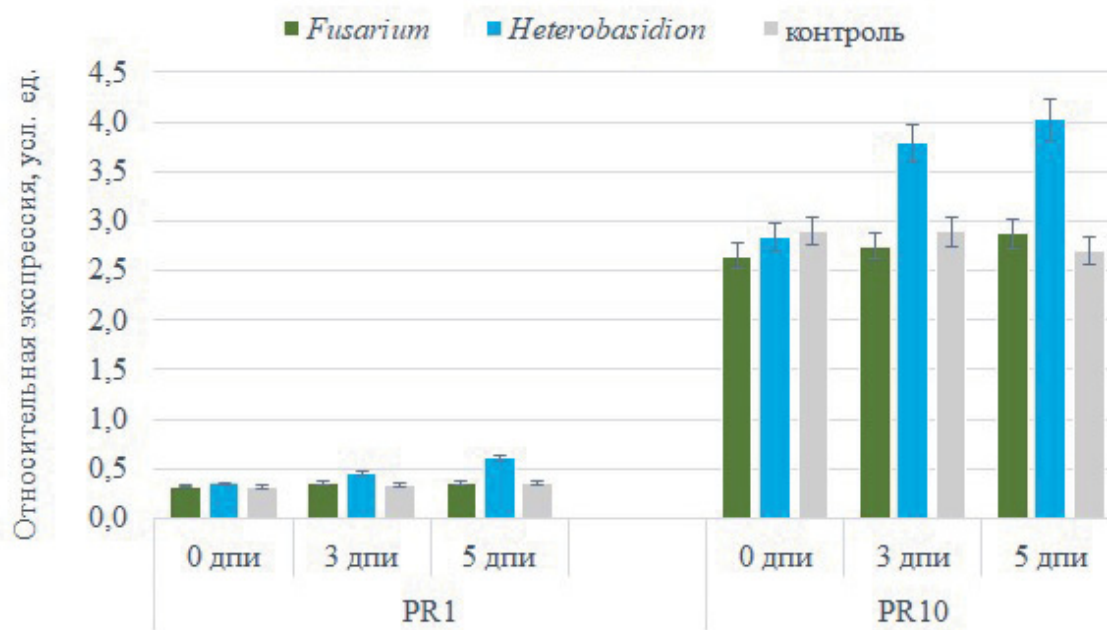


Рис. 1. Относительная экспрессия генов стрессоустойчивости у высокоурожайной сосны при заражении фитопатогенами

Анализ экспрессии гена *PR10* высокоурожайной сосны показал очень плавный и слабый рост (всего 8 % за 5 дней). Такой уровень изменения может находиться в пределах погрешности метода и не имеет биологической значимости.

Полученные данные свидетельствуют о крайне низкой устойчивости высокоурожайной сосны к фузариуму. Патоген, вероятно, либо не распознается, либо подавляет ключевые этапы иммунной сигнализации у данного генотипа.

Скачок экспрессии гена *PR1* у высокоурожайной сосны в ответ на заражение корневой губкой происходит между 3-м и 5-м днем. Это указывает на запоздалую активацию иммунного ответа: патоген успел основательно распространиться в тканях растения до того, как система защиты достигла пиковой эффективности. Наиболее активный рост экспрессии гена *PR10* у высокоурожайной сосны (в 1,4 раза) также пришелся на период с 3-го по 5-й день.

Таким образом, исследованные высокоурожайные сосны способны распознать кор-

невую губку, но их устойчивость к этому патогену можно охарактеризовать как умеренную и нестабильную. Высокоурожайная сосна требует особого внимания и контроля при выращивании, так как ее естественная защита недостаточна для надежной защиты от основных грибных патогенов. Она не рекомендуется для использования в селекционных программах на устойчивость. Может служить примером генотипа с низкой иммунной реактивностью. Не рекомендуется для посадки на участках с известными очагами фузариоза или корневой губки. Ее использование сопряжено с высоким риском заболевания и гибели. Этот генотип представляет интерес для изучения механизмов иммунной супрессии, вызванной патогенами.

Полученные данные демонстрируют значительную активацию экспрессии гена *PR1*, маркера системной приобретенной устойчивости (SAR) у растений среднеурожайной сосны, в ответ на заражение патогенами (рис. 2).

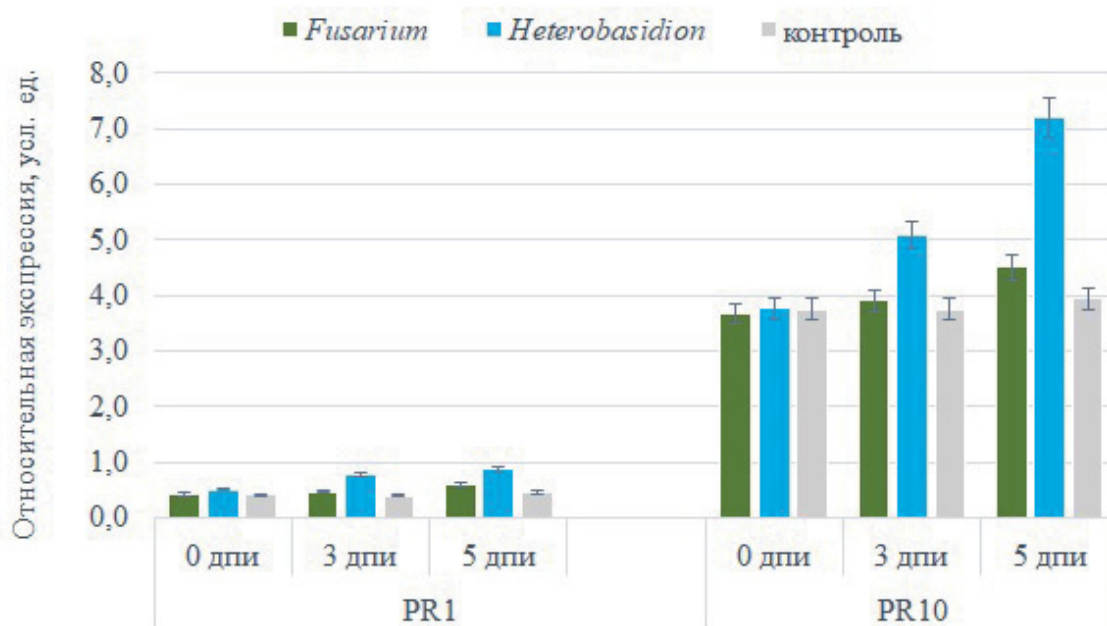


Рис. 2. Относительная экспрессия генов стрессоустойчивости у среднеурожайной сосны при заражении фитопатогенами

Наиболее сильный и прогрессирующий отклик наблюдается при заражении корневой губкой, в то время как реакция на фузариум выражена слабее. Контрольная группа сохраняет стабильно низкий уровень экспрессии.

При заражении корневой губкой среднеурожайной сосны наблюдается наиболее мощная активация гена *PR1*: уровень экспрессии к 5-му дню вырос более чем в 1,7 раза по сравнению с началом эксперимента и значительно превосходит все другие группы. Это указывает на то, что данный патоген вызывает самый сильный системный защитный ответ у среднеурожайных сосен.

При заражении фузариумом среднеурожайной сосны экспрессия гена *PR1* также повышается, но менее интенсивно. К 5-му дню рост составил примерно 1,4 раза. Это говорит об активации защитных механизмов, но, возможно, фузариум использует стратегии для подавления иммунного ответа растения, или сам иммунный ответ на этот гриб иной.

В контрольной группе среднеурожайной сосны уровень экспрессии гена *PR1* остается относительно стабильным и низким на протя-

жении всего эксперимента. Небольшое увеличение к 5-му дню может быть связано с естественными вариациями или реакцией на условия эксперимента.

Ген *PR10* демонстрирует сверхэкспрессию в ответ на патогены, особенно на *Heterobasidion annosum*; это говорит о том, что, возможно, данный ген является ключевым компонентом системы защиты сосны от грибных патогенов. Умеренное повышение уровня экспрессии гена на 6,6 % к третьему дню у сосны, зараженной фузариумом, свидетельствует о том, что организм растений распознал атаку патогена и начал запуск защитных механизмов, связанных с *PR10*. Мощный и быстрый иммунный ответ при заражении корневой губкой уже на 3-й день (в 1,5 раза) происходит при распознавании корневой губки как серьезной угрозы, приводящей к немедленной и сильной мобилизации защитных ресурсов.

Для низкоурожайных сосен характерны сверхэкспрессия гена *PR1* на третий день в ответ на заражение фузариумом (рост в 5,4 раза) и запаздывающая (на пятый день) сверхэкспрессия *PR1* на корневую губку (рис. 3).

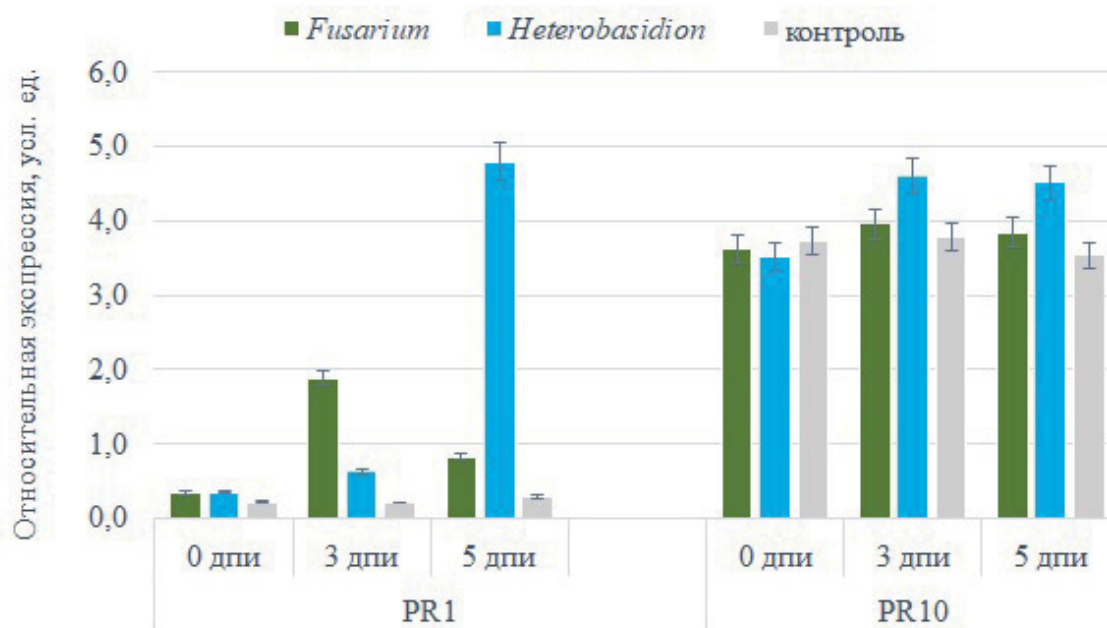


Рис. 3. Относительная экспрессия генов стрессоустойчивости у низкоурожайной сосны при заражении фитопатогенами

Гиперчувствительная реакция *PR1* на 3-й день обусловлена интенсивным выбросом сигнальных молекул системной приобретённой устойчивости (SAR). Однако к 5-му дню уровень экспрессии резко падает, что может означать: подавление ответа растений патогеном; истощение ресурсов (растения не смогли поддерживать такой интенсивный ответ); гибель клеток (реакция гиперчувствительности привела к гибели инфицированных тканей и снижению общей экспрессии).

При заражении фузариумом отмечена умеренная активация гена *PR10* (рост уровня экспрессии на 9 % к 3-му дню) с последующим спадом; ответная реакция подавлена на фоне сверхэкспрессии *PR1*.

Таким образом, иммунная система низкоурожайной сосны реагирует на фузариум чрезмерно остро, но нестабильно. Такой ответ может быть неэффективным и энергетически затратным, потенциально ведущим к повреждению собственных тканей растения.

После заражения корневой губкой низкоурожайной сосны зафиксирована запоздалая

сверхэкспрессия гена *PR1*. Если на 3-й день ответ был умеренным (рост экспрессии в 1,8 раза), то к 5-му дню происходит колоссальная активация (рост в 13,5 раз). Это указывает на то, что распознавание патогена и (или) запуск сигнального каскада заняли много времени, но позднее была достигнута пиковая эффективность иммунного ответа. Такой ответ, вероятно, высокоэффективен, но его запаздывание могло позволить патогену укрепиться.

Для гена *PR10* низкоурожайных сосен характерна умеренная и стабильная активация (рост экспрессии на 31 % к 3-му дню). Ответ похож на реакцию среднеурожайной сосны, но абсолютный уровень экспрессии почти в 2 раза ниже.

Таким образом, низкоурожайная сосна обладает мощнейшим, но медленным механизмом защиты от корневой губки, основанным на пути *PR1*; путь *PR10* играет вспомогательную роль.

Низкоурожайная сосна является генотипом с очень сильным иммунным ответом, ориентированным на путь *PR1*. Она представ-

ляет ценность как устойчивая к корневой губке форма. Ее запоздалая, но мощная реакция может быть эффективной в полевых условиях. Рекомендована для посадки на участках с риском заражения корневой губкой, но не фузариумом. На фузариозных почвах может показывать нестабильные результаты. Этот

генотип подходит для изучения регуляции пути салициловой кислоты (*PR1*).

Контрольная группа демонстрировала избирательную, адаптивную и сбалансированную иммунную реакцию, характерную для генетически разнородной группы (рис. 4).

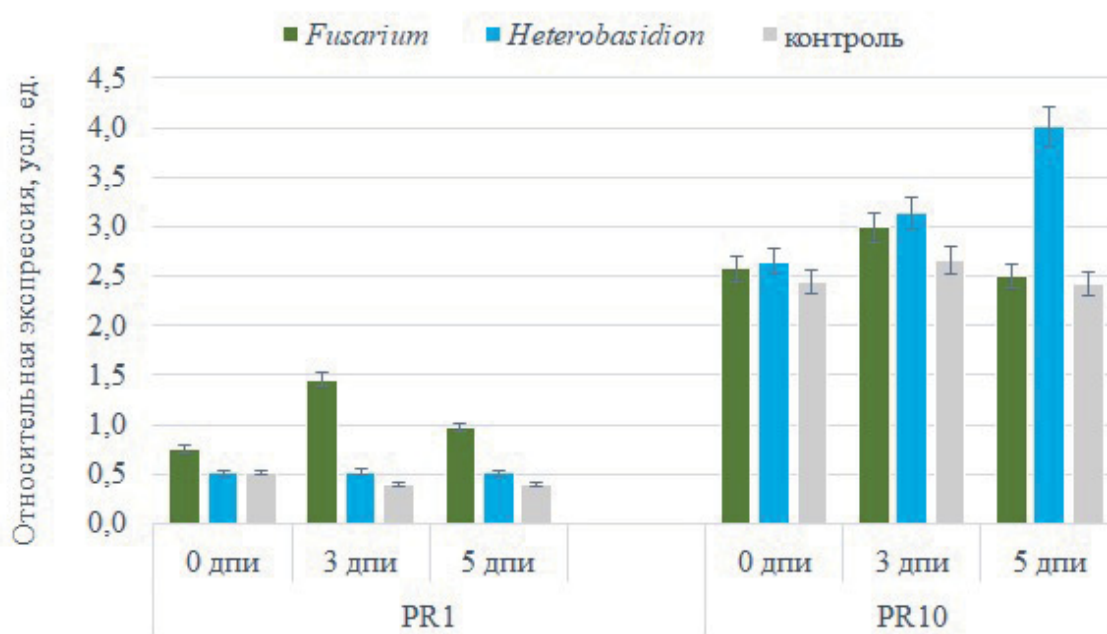


Рис. 4. Относительная экспрессия генов стрессоустойчивости у контроля сосны при заражении фитопатогенами

Её ответ сочетает в себе черты разных стратегий: эффективная реакция на фузариум (сильный, но саморегулируемый ответ гена *PR1*); запоздалая, но мощная мобилизация ресурсов против корневой губки (через активацию гена *PR10*); сбалансированность (оба гена вносят значительный вклад в защиту, в зависимости от патогена).

На 3-й день после заражения фузариумом контрольных образцов сосны наблюдается сильная активация пути SAR (рост уровня относительной экспрессии гена *PR1* в 1,9 раз). К 5-му дню уровень экспрессии снижается и стабилизируется на уровне выше исходного. Это указывает на эффективный контроль над инфекцией без исто-

щения ресурсов, в отличие от сверхэкспрессии низкоурожайной сосны. Для гена *PR10* характерна умеренная активация к 3-му дню (рост 16 %) с последующим возвратом к исходному уровню. Путь *PR10* играет вспомогательную роль против фузариума. Таким образом, контрольная группа обладает высокой и эффективной устойчивостью к фузариуму, основанной на мощной, но контролируемой активации гена *PR1*.

Ответ на заражение корневой губкой контрольных образцов сосны практически отсутствует. Уровень экспрессии гена *PR1* не меняется. Это ключевое отличие от других генотипов и указывает на то, что путь салициловой кислоты не является основным в

защите этой популяции от корневой губки. Наблюдается запоздалая, но сильная активация гена *PR10*. Основной скачок экспрессии происходит между 3-м и 5-м днем. Это демонстрирует выбор пути *PR10* для борьбы с корневой губкой. Таким образом, защита от корневой губки у данной популяции обеспечивается альтернативным механизмом, не связанным с *PR1*, а именно — через интенсивную активацию гена *PR10*. Контрольная группа демонстрирует высокую степень иммунной пластичности и адаптивности и является ценным источником разнообразных стратегий устойчивости. В его составе, вероятно, присутствуют особи с преобладанием пути *PR1* (устойчивые к фузариуму) и особи с преобладанием пути *PR10* (устойчивые к корневой губке). Это делает популяцию в целом стабильной и надежной в различных условиях и подходящей для лесовосстановления на участках со смешанной или неизвестной фитопатологической обстановкой. Генетическое разнообразие обеспечивает выживание популяции: часть деревьев будет устойчива к одним патогенам, часть — к другим, что гарантирует сохранение насаждения в целом. Данные наглядно показывают, как генетическое разнообразие на популяционном уровне проявляется в разнообразии иммунных реакций, что подтверждает важность сохранения генетического пула лесных древесных пород для их долгосрочной устойчивости.

Генетическое разнообразие является залогом выживания популяции. Сравнение высокоурожайной сосны и контроля наглядно показывает, что смешанная популяция в целом надежнее, даже если не показывает сильной устойчивости к отдельным патогенам. Для селекции важны оба пути (*PR1* и *PR10*), что показано при исследовании устойчивости к фитопатогенам среднеурожайной сосны, у которой эффективно задействованы оба пути.

Заключение

Сравнительный анализ данных показывает, что гены *PR1* и *PR10* у сосны работают в синергии, обеспечивая её защиту от патогенных грибов. При этом ген *PR10* оказывается более чувствительным и мощным маркером иммунного ответа на оба протестированных патогена, а его уровень экспрессии отражает масштаб угрозы для растения, достигая максимума при заражении корневой губкой. Эксперимент успешно зафиксировал активацию иммунного ответа у сосны на транскрипционном уровне. Корневая губка является более сильным индуктором SAR-ответа, опосредованного геном *PR1*, по сравнению с фузариумом. Ген *PR10* является специфическим маркером иммунного ответа сосны на заражение корневой губкой, в то время как его экспрессия практически не меняется при заражении фузариумом, что указывает на различную молекулярную природу устойчивости к этим патогенам.

Наиболее успешная стратегия защиты при заражении грибной инфекцией отмечена у среднеурожайной сосны, которая эффективно задействовала оба пути иммунного ответа.

Полученные данные важны для понимания механизмов устойчивости хвойных растений к различным патогенам и могут быть использованы в селекции и лесопатологии.

Исследование проводилось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 1023013000020–6-4.1.2 «Отбор хозяйственно ценных и устойчивых к изменению климата древесных культур, отличающихся высокой биологической продуктивностью и потенциалом секвестрации углерода с учетом региональных почвенно-климатических особенностей для реализации лесоклиматических проектов (FZUR-2023–0002)».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вогралик, П.М. Токсинообразующие грибы рода *Fusarium* sp. / П.М. Вогралик // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 3. – С. 2.
2. Леунов, В.И. Методы ускоренной селекции моркови столовой на комплексную устойчивость к грибным болезням (*Alternaria* и *Fusarium*) // В.И. Леунов, А.Н. Ховрин, Т.А. Терешонкова [и др.] : Методические рекомендации. – М. : изд-во «Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства», 2011. – 61 с.
3. Лыков, И.В. Обзор современного состояния и эффективности мероприятий по защите сосновых насаждений от корневой губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) / И.В. Лыков, П.А. Максимчук // Лесотехнический журнал. – 2021. – № 3 (43). – С. 63–73.
4. Пашенова, Н.В. Использование высечек из листьев ясеня для изучения фитопатогенных свойств гриба *Hymenoscyphus fraxineus* / Н.В. Пашенова, Л.Г. Серая, Ю.Н. Баранчиков // Сибирский лесной журнал. – 2023. – № 1. – С. 58–69.
5. Ahuja, I. Phytoalexins in defense against pathogens / I. Ahuja, R. Kissen, A.M. Bones // Trends Plant Sci. – 2012. – № 17. – P. 73–90.
6. Ali, S. Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from *Brassica juncea* / S. Ali, N. Chandrashekar, S. Rawat [et al.] // Biol. Plant. – 2017. – № 61. – P. 763–773.
7. Ali, S. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance / S. Ali, B. Ganai, A. Kamili [et al.] // Microbiological research. – 2018. – № 212–213. – P. 29–37.
8. Bohlmann, H. The role of thionins in plant protection / H. Bohlmann // Critical Reviews in Plant Sciences. – 1994. – № 13. – P. 1–16.
9. Bowles, D.J. Defense-related proteins in higher plants / D.J. Bowles // Annu. Rev. Biochem. – 1990. – № 59. – P. 873–907.
10. Broekaert, W.F. Induced and preformed antimicrobial proteins / W.F. Broekaert, F.R.G. Terras, B.P.A. Cammue // Mechanisms of Resistance to Plant Diseases / Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. Van Loon. – Dordrecht, 2000. – P. 371–477.
11. Dean, R. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology / R. Dean, J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius [et al.] // Mol. Plant Pathol. – 2012. – № 13. – P. 414–430.
12. Egorov, T.A. Diversity of wheat anti-microbial peptides / T.A. Egorov, T.I. Odintsova, V.A. Pukhalsky, E.V. Grishin // Peptides. – 2005. – № 26. – P. 2064–2073.
13. Garcia-Olmedo, F. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants / F. Garcia-Olmedo, A. Molina, A. Segura, M. Moreno // Trends in Microbiology. – 1995. – № 3. – P. 72–74.
14. Goldman, M.H.S. *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions / M.H.S. Goldman, G.H. Goldman // Genetics and Molecular Biology. – 1998. – № 21. – P. 329–333.
15. Haran, S. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* / S. Haran, H. Schickler, I. Chet // Microbiology. – 1996. – № 142. – P. 2321–2331.
16. Honee, G. Engineered resistance against fungal plant pathogens / G. Honee // Eur. J. Plant Pathol. – 1999. – № 105. – P. 319–326.
17. Koiwa, H. Regulation of protease inhibitors and plant defense / H. Koiwa, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa // Trends in Plant Science. – 1997. – № 2. – P. 379–384.
18. Kombrink, E. Pathogenesis-related proteins and plant defense / E. Kombrink, I.E. Somssich // Plant Relationships. The Mycota V, Part A. – Berlin : Springer Verlag, 1997. – P. 107–128.

19. Moiseyev, G.P. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins / G.P. Moiseyev, L.I. Fedoreyeva, Y.N. Zhuravlev [et al.] // FEBS Letters. – 1997. – № 407. – P. 207–210.
20. Návarová, H. Pipelicolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity / H. Návarová, F. Bernsdorff Döring, A.C.J. Zeier // Plant Cell. – 2012. – № 24. – P. 5123–5141.
21. Ryan, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens / C.A. Ryan // Annual Review of Phytopathology. – 1990. – № 28. – P. 425–449.
22. Sels, J. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides / J. Sels, J. Mathys, B.M. De Coninck [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2008. – № 46. – P. 941–950.
23. Shi, Y.L. Cloning and expression analysis of two β -1, 3 glucanase gene from strawberry / Y.L. Shi, Y.H. Zhang, D.S. Shih // J. Plant Physiol. – 2006. – № 163. – P. 956–967.
24. Stuiver, M.H. Engineering disease resistance in plants / M.H. Stuiver, J.H. Custers // Nature. – 2011. – № 411. – P. 865–868.
25. Takemoto, D. Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells / D. Takemoto, K. Furuse, N. Doke, K. Kawakita // Plant & Cell Physiology. – 1997. – № 38. – P. 441–448.
26. Van Loon, L.C. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / L.C. Van Loon, E.A. Van Strien // Physiol. Mol. Plant Path. – 1999. – № 55. – P. 85–97.
27. Wally, O. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants / O. Wally, Z.K. Punja // GM Crops. – 2010. – № 1. – P. 199–206.
28. Wang, X. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins / X. Wang, P. Zafian, M. Choudhary, M. Lawton // Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. – 1996. – № 93. – P. 2598–2602.

REFERENCES

1. Vogralik P.M. Toxin-forming fungi of the genus *Fusarium* sp. *Journal of Siberian Medical Sciences [Medicina i obrazovanie v Sibiri]*, 2009, no. 3, p. 2. (In Russian).
2. Leunov V.I., Hovrin A.N., Tereshonkova T.A., Sokolova L.M., Gorshkova N.S., Alekseeva K.L. Methods of accelerated selection of table carrots for complex resistance to fungal diseases (*Alternaria* i *Fusarium*). Metodicheskie rekomendacii, Moscow, Publishing House “State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Vegetable Growing”, 2011, 61 p. (In Russian).
3. Lykov I.V., Maksimchuk P.A. A review of the current state and effectiveness of measures to protect pine stands from root rot (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.). *Forestry Journal [Lesotekhnicheskij zhurnal]*, 2021, no. 3 (43), pp. 63–73. (In Russian).
4. Pashenova N.V., Seraya L.G., Baranchikov Yu.N. Using ash leaf cuttings to study the phytopathogenic properties of the fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. *Siberian Forestry Journal [Sibirskij lesnoj zhurnal]*, 2023, no. 1, pp. 58–69. (In Russian).
5. Ahuja I., Kissen R., Bones A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*, 2012, no. 17, pp. 73–90.
6. Ali S., Chandrashekar N., Rawat S., Nayanakantha N.M.C., Mir Z.A., Manoharan A., Sultana M., Grover A. Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from *Brassica juncea*. *Biol. Plant*, 2017, no. 61, pp. 763–773.

7. Ali S., Ganai B., Kamili A., Bhat A.A., Mir Z., Bhat J., Tyagi A., Islam Sh. T., Mushtaq M., Yadav P., Rawat S., Grover A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological research*, 2018, no. 212–213, pp. 29–37.
8. Bohlmann H. The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, no. 13, pp. 1–16.
9. Bowles D.J. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, no. 59, pp. 873–907.
10. Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammue B.P.A. Induced and preformed antimicrobial proteins. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. Van Loon. Dordrecht, 2000, pp. 371–477.
11. Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 2012, no. 13, pp. 414–430.
12. Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 2005, no. 26, pp. 2064–2073.
13. Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, 1995, no. 3, pp. 72–74.
14. Goldman M.H.S., Goldman G.H. *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions. *Genetics and Molecular Biology*, 1998, no. 21, pp. 329–333.
15. Haran S., Schickler H., Chet I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 1996, no. 142, pp. 2321–2331.
16. Honee G. Engineered resistance against fungal plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1999, no. 105, pp. 319–326.
17. Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 1997, no. 2, pp. 379–384.
18. Kombrink E., Somssich I.E. Pathogenesis-related proteins and plant defense. Plant Relationships. *The Mycota V, Part A / Carroll G., Tudzynski P., eds.* Berlin: Springer Verlag, 1997, pp. 107–128.
19. Moiseyev G.P., Fedoreyeva L.I., Zhuravlev Y.N., Yasnetskaya E., Jekel P.A., Beintema J.J. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Letters*, 1997, no. 407, pp. 207–210.
20. Návarová H., Bernsdorff Döring F., Zeier A.C.J. Pipecolic acid, an endogenous Mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell*, 2012, no. 24, pp. 5123–5141.
21. Ryan C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1990, no. 28, pp. 425–449.
22. Sels J., Mathys J., De Coninck B.M., Cammue B.P., De Bolle M.F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, 2008, no. 46, pp. 941–950.
23. Shi Y.L., Zhang Y.H., Shih D.S. Cloning and expression analysis of two β -1, 3 glucanase gene from strawberry. *J. Plant Physiol*, 2006, no. 163, pp. 956–967.
24. Stuiver M.H., Custers J.H. Engineering disease resistance in plants. *Nature*, 2011, no. 411, pp. 865–868.
25. Takemoto D., Furuse K., Doke N., Kawakita K. Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells. *Plant & Cell Physiology*, 1997, no. 38, pp. 441–448.
26. Van Loon L.C., Van Strien E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1999, no. 55, pp. 85–97.

27. Wally O., Punja Z.K. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops*, 2010, no. 1, pp. 199–206.
28. Wang X., Zafian P., Choudhary M., Lawton M. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 1996, no. 93, pp. 2598–2602.

Статья поступила в редакцию 20.11. 2025