

## БИОЛОГИЯ

УДК 575:582.475(571.621)

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЛИСТВЕННИЦЫ В ЕВРЕЙСКОЙ АВТОНОМНОЙ ОБЛАСТИ И ОЦЕНКА ЕЕ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ

Е.Н. Амяга<sup>1</sup>, С.П. Исаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>филиал ФБУ «Рослесозащита» – «ЦЗЛ Хабаровского края»,  
ул. Надсоновская 13, г. Пушкино, 141207,  
e-mail: amyagaen@rcfh.ru;

<sup>2</sup>Тихоокеанский государственный университет,  
ул. Тихоокеанская 136, г. Хабаровск, 680035,  
e-mail: 000350@pnu.edu.ru

*В настоящее время особенно остро стоит вопрос об изучении на генетическом уровне ценных лесных пород с целью обеспечения их сохранности, видовой идентификации и контроля происхождения древесины. Одной из таких важных в экологическом и экономическом отношениях хвойных пород нашей страны является лиственница (Larix). Сохранение и изучение генетического разнообразия видов лесных растений, в том числе на территории Еврейской автономной области, – одна из фундаментальных проблем современных ботаники, экологии, генетики и дендрологии. В статье проанализированы образцы хвои насаждений лиственницы, собранные в Еврейской автономной области. С помощью генетического метода подобраны необходимые для анализа локусы, при помощи которых проанализированы видовые особенности Larix gmelinii и Larix sibirica.*

*Не менее актуальной является проблема поражения растений фитопатогенами. Фитопатоген – это возбудитель болезни растений, который выделяет биологически активные вещества, губительно действующие на обмен веществ, поражая корневую систему, нарушая функцию хлоропластов, ростовые процессы, поступление питательных веществ. Нарушение обмена веществ в клетках и органах растений, приводящее к снижению продуктивности либо к их полной гибели, способствует потере целостности популяций и наносит огромный вред как сельскохозяйственным культурам, так и лесобразующим породам. В работе приведены результаты анализа фитосанитарного состояния насаждений лиственницы и выявлен процент здоровых и пораженных насаждений по районам.*

*Проведенный комплексный анализ показал, что лабораторные методы успешно дополняют друг друга. Используя одновременно несколько методик для выявления фитопатогена, возможно дать полную и верную характеристику его таксономических и биологических особенностей. Своевременная и точная идентификация фитопатогенных грибов необходима для изучения их эволюции и взаимоотношений с растениями-хозяевами, генетических основ восприимчивости и устойчивости растений, что в итоге должно помочь в разработке способов борьбы с патогенами.*

**Ключевые слова:** лиственница, Larix gmelinii, Larix sibirica, Еврейская автономная область, фитосанитарное состояние, фитопатогены.

**Образец цитирования:** Амяга Е.Н., Исаев С.П. Определение видовой принадлежности лиственницы в Еврейской автономной области и оценка ее фитосанитарного состояния // Региональные проблемы. 2021. Т. 24, № 1. С. 3–9. DOI: 10.31433/2618-9593-2021-24-1-3-9.

### Актуальность (постановка проблемы)

Разработка методов выявления полиморфизма ДНК и работа с генетическими маркерами позволяет вести мониторинг динамики генетического разнообразия. За последние десятилетия, благодаря развитию лесной генетики, осуществляются программы воспроизводства и восстановления природных популяций лесных пород, охарактеризована генетическая изменчивость хозяйственно ценных видов и видов, находящихся под угрозой исчезновения. Самой распространенной и экономически значимой лесной породой на планете является лиственница (*Larix*). Ареал ее произрастания обширен – Урал, Западная Сибирь, Алтай, Саяны, Дальний Восток, Китай, северо-запад Монголии [1–3]. Ее древесина, благодаря прочности и устойчивости к гниению, используется в судостроении, строительстве гидротехнических сооружений, получении целлюлозы. Лиственница также является декоративной породой и широко применяется в озеленении городов и в зеленом садово-парковом строительстве, но перспектива разведения лиственницы в городских условиях, где сильно сказывается техногенная нагрузка на древесные организмы, изучается до сих пор.

Насаждения лиственницы в Еврейской автономной области (ЕАО) встречаются повсеместно и обладают различными фенотипическими особенностями [4], в том числе величина и цвет шишки; длина, цвет и форма хвои, а также высота и диаметр ствола. Фитосанитарное состояние насаждений при визуальном осмотре оценено достаточно высоко, но для предотвращения развития заболеваний, которые на первых этапах развития визуально не определяются, возникла необходимость диагностики заболеваемости фитопатогенными организмами.

При подборе ядерных микросателлитных локусов для сравнения генетических профилей лиственницы даурской и лиственницы сибирской, а также их подвидов проанализировали 19 локусов. Из них для видовой идентификации были отобраны лишь 5, с разными показателями для разных видов *Larix* (табл. 5) [2]. Отбор именно этих 5 локусов обусловлен тем, что показатели длин у *Larix dahurica* и *Larix sibirica* по ним отличаются, а по остальным локусам разницы в значениях не наблюдалось.

В результате анализа 142 образцов лиственницы на территории ЕАО отмечено полное соответствие показателям длин и характеристик для ядерных микросателлитных локусов, указанных

в табл. 5 для *Larix dahurica* и *Larix sibirica* и их подвидов.

**Цель работы** – определить генетическим методом видовую принадлежность лиственницы в ЕАО и провести оценку ее фитосанитарного состояния микробиологическим и микроскопическим методами, выявить род и вид возбудителя инфекции.

В лаборатории лесной генетики в филиале ФБУ «Рослесозащита» – «ЦЗЛ Хабаровского края» проводятся комплексные исследования фитопатогенов. Результаты выполняемых работ позволяют не только определить наличие возбудителя инфекции, но и дать его полную характеристику.

Генетический метод обнаружения возбудителя инфекции позволяет его обнаруживать, когда видимых признаков поражения еще нет, что обеспечивает своевременное принятие мер по защите растения. Обеспечивается возможность выполнения скрининговых исследований на заболевания вирусной, грибковой или бактериальной природы.

### Объект и методы исследования

В августе 2020 года проведено визуальное обследование насаждений лиственницы на территории ЕАО в 7 лесничествах (табл. 1) на предмет видовой принадлежности и зараженности фитопатогенами.

Исходя из актуальности темы, объектами изучения являлись лиственница даурская *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen. и лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.).

Таблица 1  
Распределение образцов лиственницы по лесничествам Еврейской автономной области

Table 1  
Distribution of larch samples by the forest areas of Jewish Autonomous Region

Лесничество/участковое лесничество/квартал/выдел	Количество образцов
Биробиджанское/Городское/68/14	40
Облученское/Облученское/200/20	40
Облученское/Облученское/200/30	20
Облученское/Облученское/200/31	7
Облученское/Облученское/200/21	5
Биробиджанское/ Смидовичское/130/18	10
Питомник 33,34 кв	20

Характеристика ядерных микросателлитных локусов, отобранных для сравнения *Larix dahurica* и *Larix sibirica* [9, 13, 14]

Table 2

Characteristics of nuclear microsatellite loci selected for the comparison of *Larix dahurica* and *Larix sibirica* [9, 13, 14]

Локус	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига	Размер фрагмента (Бондар, 2018)
Ls_1524449	FW: CGACAACACAGTCCATTTTCATC RV: ACATCTATTCCCCTCCCAATTC	Touchdown 60–51 °C	179
Ls_951631	FW: GAAACATCGTGA CTTCCTTTGA RV: CAACGAAACAATGGCTACAAAC	Touchdown 60–51 °C	150
Ls_254200	FW: TTGTAATGCACCTTCAACTCCA RV: ACCATTTGGGCAGTGT TTG	Touchdown 60–51 °C	252

Ядерные микросателлитные локусы, изменчивость которых была проанализирована для сравнения образцов лиственницы даурской и лиственницы сибирской, представлены в табл. 2.

ПЦР проведена с использованием набора лиофилизированных готовых реакционных смесей GenPak™ PCR Core (0.5 ml) производства ООО «Лаборатория Изоген» [13].

Визуализация ПЦР-продуктов проведена методом вертикального электрофореза в 5%-м полиакриламидном геле [2]. В качестве маркера стандартных длин использовалась ДНК плазмиды pBR322, обработанная рестриктазой Hpa II.

Размер ампликонов определяли в программе Photo-Capt. Анализ полученных генотипов проводили в программе GenAIEx 6.2 [13].

Для выявления возможных фитопатогенов образцы хвои лиственницы высушивали на фильтровальной бумаге в чашке Петри, затем спустя 3 суток микроскопическим методом определяли наличие фитопатогенов.

В работе также использовали методы анализа ДНК, описанные или разработанные в Инсти-

туте леса НАН Беларуси. Выделение ДНК проводили методом СТАВ [10, 11]. Для диагностики фитопатогенов в полимеразно-цепной реакции (ПЦР) использовали 2 типа праймеров: универсальные и видоспецифические (табл. 3).

Детекцию результатов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле, визуализацию продуктов проводили путем окрашивания в растворе бромистого этидия. В качестве контроля использовали заранее подготовленные поврежденные ткани и плодовые тела патогенов [1, 9].

#### Результаты и обсуждение

Данная исследовательская работа является частью работ Российского центра защиты леса (РЦЗЛ) по созданию единой генетической базы данных основных лесобразующих пород.

В табл. 4 отображены результаты видовой идентификации лиственницы.

У 57 образцов от общего отобранного объема выявлены незначительные отличия от показателей лиственницы даурской в длине фрагмента в области локуса bcLK 232 и UAKLly6, но эти дан-

Таблица 3

Универсальные праймеры для определения рибосомальной ДНК грибов-патогенов

Table 3

Universal primers for the determination of pathogenic fungi ribosomal DNA

Локус	Праймер, последовательность нуклеотидов
ITS (рДНК)	ITS1 tcc-gta-ggt-gaa-cct-gcg-g (Daniel K. Manter 1, Jorge M. Vivanco, 2007)
	ITS2 gct-gcg-ttc-ttc-atc-gat-gc (Daniel K. Manter 1, Jorge M. Vivanco, 2007)
	ITS3 gca-tcg-atg-aag-aac-gca-gc (Daniel K. Manter 1, Jorge M. Vivanco, 2007)
	ITS4 tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc (Daniel K. Manter 1, Jorge M. Vivanco, 2007)

Таблица 4  
Результаты видовой идентификации лиственницы по лесничествам Еврейской автономной области

Table 4

Results of larch species identification in the forest areas of Jewish Autonomous Region

Лесничество/ уч.лесничество/кв/в	Количество образцов	Лиственница Гмелина (даурская), Каяндера	Гибриды	Лиственница сибирская
Биробиджанское/Смидовичское/130/18	10	8	2	
Питомник 33,34 кв	20	9	11	
Биробиджанское/Городское/68/14	40	20	20	
Облученское/Облученское/200/20	40	25	12	3
Облученское/Облученское/200/30	20	15	5	
Облученское/Облученское/200/31	7	4	2	1
Облученское/Облученское/200/21	5		5	

ные не соответствуют показателям лиственницы сибирской (табл. 5).

Среди проанализированных образцов также выявлены 4 образца, все показатели в области обследованных локусов по которым соответствуют лиственнице сибирской.

С целью подтверждения полученных результатов были проведены дополнительные исследования по видовой идентификации на основании методики, представленной в рамках магистерской диссертации Е.И. Бондар под руководством к.б.н. Н.В. Орешковой «Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской на основании полногеномного de novo секвенирования».

Проведенные на основании указанной ра-

боты исследования подтвердили принадлежность исследуемых образцов к лиственницам Гмелина и Каяндера и близким им таксонам, а также выявлены гибридные формы у 81 образца.

В области локуса Ls\_1524449 в анализируемых образцах «выявлены нестабильные спектры с большим числом нуль-аллелей», что, согласно методике, описанной в работе Е.И. Бондар, является характерным для лиственницы Гмелина (*L. gmelinii*) и для лиственницы Каяндера (*L. cajandera*) (табл. 5).

В области локуса Ls\_951631, по данным Е.И. Бондар, «в популяции лиственницы Каяндера отмечен слишком большой разброс в различии аллельных вариантов. А для лиственницы сибир-

Таблица 5

Характеристика ядерных микросателлитных локусов, подобранных для видовой идентификации *Larix*

Table 5

of nuclear microsatellite loci selected for *Larix* species identification

Локус	Показатели ядерных микросателлитных локусов	
	<i>Larix dahurica</i> и ее подвиды	<i>Larix sibirica</i> и ее подвиды
UACLy6	214–262 п.н.	180–215 п.н.
bcLK232	133–149 п.н.	151–164 п.н.
Ls_1524449	нестабильные спектры с большим числом нуль-аллелей	высокополиморфный с 9 аллельными вариантами
Ls_951631	большой разброс в различии аллельных вариантов	полиморфизм
Ls_254200	слабая полиморфность	значительный полиморфизм, нестабильная амплификация

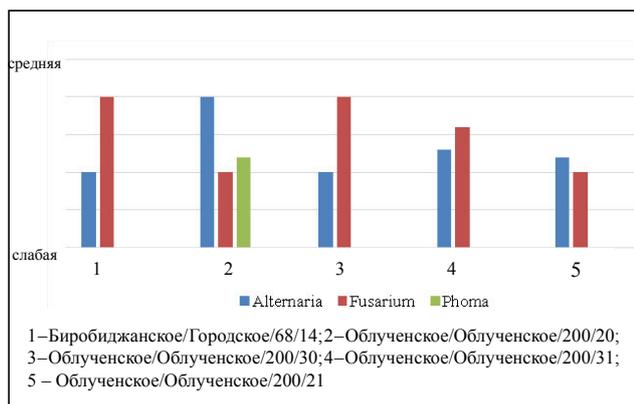
ской данный локус «показал себя полиморфным». В настоящей работе с исследуемыми образцами данный локус оказался преимущественно мономорфным, что не соответствует описанному в методике Е.И. Бондар данным ни для лиственницы даурской, ни для лиственницы сибирской (табл. 5).

Анализ локуса Ls\_254200 показал слабую полиморфность для исследуемых образцов, хотя изначально они выглядели мономорфными, что соответствует показателям лиственниц Каяндера и Гмелина, но не соответствует описанному в методике показателям для лиственницы сибирской – «полиморфный, но с большим числом нуль-аллелей и нестабильной амплификацией» (табл. 5).

#### Фитопатологическое обследование насаждений лиственницы в Еврейской автономной области

Для выявления и характеристики состояния насаждений лиственницы в ЕАО проведено комплексное обследование на наличие фитопатогенной флоры.

В результате в 32 исследуемых образцах хвои лиственницы из Облученского и Биробиджанского лесничеств методом электронной микроскопии обнаружены споры грибов из рода *Fusarium*, *Alternaria*, вызывающие загнивание семян, проростков, всходов и в целом полегание сеянцев, а в 4 образцах хвои лиственницы из Облученского лесничества грибы из рода *Phoma*, которые вызывают сухую гниль. Заражение растений патогеном происходит в период переувлажненности почвы через хвою, контактирующую с землей, затем патоген распространяется вдоль по стеблю и вызы-



**Рис. Степень зараженности патогенными грибами образцов почвы из 5 питомников Еврейской автономной области**

**Fig. The degree of infection with pathogenic fungi of soil samples from 5 nurseries of the Jewish Autonomous Region**

вает гибель верхушечной почки растения [2, 5].

Следует отметить, что резервуаром *Alternaria* являются отмирающие растения и растительные остатки, с которых гриб попадает в почву. Наряду с другими грибами *Alternaria* принимает участие в разложении и минерализации растительных остатков. Этому способствует огромный комплекс ферментов [9].

Степень зараженности во всех исследуемых образцах преимущественно слабая (рис.).

Основываясь на совокупности лабораторных методов, удалось определить подходы к обнаружению фитопатогенов, что позволяет предложить комплекс мероприятий по защите растений.

#### Заключение

В результате выполнения работы:

- отобраны локусы, отработаны праймеры к ним, по которым возможно выявить различия между лиственницей даурской и лиственницей сибирской и их подвидами, а также сравнить их генетические профили;

- определены значения длин фрагментов ДНК, отмечены характерные показатели полиморфизма в области отобранных 5 локусов.

На основе проведенного анализа выявлено, что среди проанализированных образцов лиственницы 4 образца из Облученского лесничества являются лиственницей сибирской (*Larix sibirica*), 81 образец – лиственница Гмелина (*Larix dahurica*), 57 образцов являются гибридами.

Проведенный комплексный лабораторный анализ показал, что лабораторные методы успешно дополняют друг друга. Используя одновременно несколько лабораторных методик для выявления фитопатогена, возможно дать полную и верную характеристику его таксономических и биологических особенностей. Своевременная и точная идентификация фитопатогенных грибов необходима для изучения их эволюции и взаимоотношений с растениями-хозяевами, генетических основ восприимчивости и устойчивости растений, что в итоге должно помочь в разработке способов борьбы с патогенами.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1987. 189 с.
2. Бондар Е.И. Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования: автореф. магистр. дис. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2018. 65 с.

3. Дылис Н.В. Лиственница. М.: Лесн. пром-сть, 1981. 96 с.
4. Куренцова Г.Э. Естественные и антропогенные смены растительности Приморья и Южного Приамурья. Новосибирск: Наука, 1973. 230 с.
5. Орешкова Н.В. Популяционно-генетические параметры лиственницы Гмелина в Восточном Забайкалье // Вестник ТГУ. 2009. № 328. С. 193–198.
6. Орешкова Н.В. Аллозимный полиморфизм ферментов лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. XXV, № 1–2. С. 160–167.
7. Орешкова Н.В., Белоконов М.М., Жамьянсурен С. Изменчивость ядерных микросателлитных локусов у лиственниц Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) и камчатской (*Larix kamtchatica* (Rupr.)) // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30, № 1–2. С. 145–151.
8. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых Северной Евразии: автореф. дис.... докт. биол. наук. М.: Ин-т общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2007. 47 с.
9. Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction // Can. J. For. Res. 1990. Vol. 20. P. 254–257.
10. Hamrick J.L. Response of forest trees to global environmental changes // Forest Ecology and Management. 2004. Vol. 197, N 1–3. P. 323–335.
11. Khasa D.P. Contrasting microsatellite variation between sub-alpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15, N 13. P. 3907–3918.
12. Isoda K. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15, N 3. P. 664–666.
13. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6. P. 288–295.
14. Taheri S. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants // Molecules. 2018. Vol. 23, N 2. P. 399.
2. Bondar E.I. *Razrabotka mikrosatellitnykh markerov listvennitsy sibirskoi (Larix sibirica Ledeb.) na osnove polnogenomnogo de novo sekvenirovaniya* (Development of Microsatellite Markers for Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) on the Basis of Genome-wide de novo Sequencing). Extended Abstract of Master Dissertation. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2018. 65 p. (In Russ.).
3. Dylis N.V. *Listvennitsa* (Larch). Moscow: Lesnaya promyshlennost' Publ., 1981. 96 p. (In Russ.).
4. Kurentsova G.E. *Estestvennye i antropogennye smeny rastitel'nosti Primor'ya i Yuzhnogo Priamur'ya* (Natural and anthropogenic changes in the vegetation of Primorye and the Southern Amur region). Novosibirsk: Nauka Publ, 1973. 230 p. (In Russ.).
5. Oreshkova N.V. Population-genetic parameters of Gmelin Larch in Eastern Zabaikalje (Chita Region). *Vestnik TGU*, 2009, no. 328, pp. 193–198. (In Russ.).
6. Oreshkova N.V. Allozyme Polymorphism of Enzymes of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Cajander Larch (*Larix cajanderi* Mayr). *Khvoynye boreal'noi zony*, 2008, vol. 25, no. 1–2, pp. 160–167. (In Russ.).
7. Oreshkova N.V., Belokon' M.M., Zham'yansuren S. Variability of Nuclear Microsatellite Loci in Gmelin Larch (*Larix gmelinii* (Rupr.) and Kamchatka Larch (*Larix kamtchatica* (Rupr.)). *Khvoynye boreal'noi zony*, 2012, vol. 30, no. 1–2, pp. 145–151. (In Russ.).
8. Politov D.V. Population Genetics and Evolutionary Relationships of the Pinaceae of Northern Eurasia. *Extended Abstract of Doct. Sci. (Biol.) Dissertation*. Moscow: N.I. Vavilov' Institute of General Genetics RAS, 2007. 47 p. (In Russ.).
9. Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. For. Res.*, 1990, no. 20, pp. 254–257.
10. Hamrick J.L. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 2004, vol. 197, no. 1–3, pp. 323–335.
11. Khasa D.P. Contrasting microsatellite variation between sub-alpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns. *Molecular Ecology*, 2006, vol. 15, no. 13, pp. 3907–3918.
12. Isoda K. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi*. *Molecular Ecology*, 2006, vol. 15, no. 3, pp. 664–666.

#### REFERENCES:

1. Bobrov E.G. *Lesoobrazuyushchie khvoynye SSSR* (Forest-forming conifers of the USSR). Leningrad: Nauka Publ., 1987. 189 p. (In Russ.).

13. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, pp. 288–295.
14. Taheri S. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 2, 399.

## DETERMINATION OF LARCH SPECIES IN THE JEWISH AUTONOMOUS REGION AND ASSESSMENT OF ITS PHYTOSANITARY STATE

E.N. Amyaga, S.P. Isaev

*At present, it is especially acute to study valuable forest species at the genetic level in order to ensure their safety, species identification and the origin of wood control. Larch (Larix) is one of the ecologically and economically important conifers in our country. Preservation and study of the forest plant species genetic diversity anywhere, including the Jewish Autonomous Region (EAO), is one of the fundamental challenges of modern botany, ecology, genetics and dendrology. In the article, the author analyzes samples of larch stand needles collected in the Jewish Autonomous Region. Using the necessary loci, selected by means of the genetic method, the author analyzed features of the Larix gmelinii and Larix sibirica species [4]*

*No less urgent is the problem of plant damage by phytopathogens. A phytopathogen is a causative agent of plant disease that releases biologically active substances that have a detrimental effect on metabolism, affecting the root system, disrupting the function of chloroplasts, growth processes, and the supply of nutrients. Violation of metabolism in plant cells and organs, resulted in their productivity decrease or complete death, leads to the disruption of populations' integrity and causes enormous harm to both agricultural crops and forest-forming species. This work shows the results of analysis of the larch plantations phytosanitary state and the percentage of healthy and affected plantations in the regions.*

*The comprehensive laboratory analysis has shown that the laboratory methods successfully complement each other. It is possible to give a complete and correct description of taxonomic and biological characteristics of a phytopathogen using simultaneously several laboratory techniques for its identification. Ultimately, it should be of help in the development of methods for combating pathogens.*

**Keywords:** *larch, Larix gmelinii, Larix sibirica, Jewish Autonomous Region, phytosanitary condition, phytopathogens.*

**Reference:** Amyaga E.N., Isaev S.P. Determination of larch species in the Jewish Autonomous Region and assessment of its phytosanitary state. *Regional'nye problemy*, 2021, vol. 24, no. 1, pp. 3–9. (In Russ.). DOI: 10.31433/2618-9593-2021-24-1-3-9.