

А. М. Нестюк¹, С. В. Пантелеев², В. А. Ярмолович¹, О. Ю. Баранов^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА STS-МАРКЕРОВ ИЗОЛЯТОВ КОРНЕВОЙ ГУБКИ, ИНФИЦИРУЮЩИХ ЕЛЬ ЕВРОПЕЙСКУЮ (*PICEA ABIES* (L.) H. KARST.) В БЕЛАРУСИ

¹Белорусский государственный технологический университет
Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а
e-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

²Институт леса НАН Беларуси

Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71

³Отделение биологических наук НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, пр. Независимости, 66

В статье приведены результаты изучения генетического полиморфизма изолятов корневой губки, инфицирующих ель европейскую (*Picea abies*) в различных регионах Беларуси. На основании полученных данных осуществлена сравнительная оценка пригодности STS-маркеров для видовой диагностики изолятов корневой губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) и *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen). Экспериментальный материал в виде плодовых тел корневой губки и высечек инфицированной данным фитопатогеном древесины был отобран в насаждениях ели европейской на территории трех геоботанических подзон в семи Государственных лесохозяйственных учреждениях Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, а также на территории Негорельского учебно-опытного лесхоза и Национального парка «Беловежская пуща». На основании проведенного комплексного анализа образцов рекомендованы маркеры для проведения видовой молекулярно-генетической диагностики *H. annosum* и *H. parviporum*.

Ключевые слова: корневая губка, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., видовой идентификация, молекулярно-генетический анализ, STS-маркеры.

Введение

Грибы рода *Heterobasidion* spp. являются наиболее распространенными возбудителями корневой гнили у хвойных пород деревьев северного, умеренного и бореального поясов. Впервые возбудитель корневой гнили хвойных древесных пород был описан еще в 1821 году Е. Fries как *Polyporus annosus* Fr. [1]. С 1930-х гг. некоторые ученые начали поиск географических рас гриба на основе их приуроченности к древесным видам. Однако, несмотря на выявленные различия в биохимических свойствах и патогенности, долгое время отдельные расы выделить не удавалось [2, 3]. Различные группы данного фитопатогена были выделены учеными только в конце XX века из комплекса видов Северного полушария *Heterobasidion annosum sensu lato* после проведения опытов по взаимной оплодотворяемости. В результате были выделены три европейские группы (P, S и F) на территории Евразии и две (P и S) — на

территории Северной Америки [1, 4, 5].

Несмотря на явную дифференциацию различных групп *Heterobasidion* относительно их взаимной оплодотворяемости, они не являются абсолютно интерстерильными. Гомокариотические чистые культуры из разных групп способны спариваться друг с другом с различной частотой. В Европе совместимость между группами S и F составляет 25–75%, в зависимости от происхождения изолятов S. Совместимость между группами P и S составляет около 10%, также низкие показатели между группами P и F. Совместимость североамериканских групп S и P составляет примерно 18%. Совместимость между европейской и североамериканской P группами довольно высокая, однако не абсолютная, а североамериканская S-группа демонстрирует высокую совместимость как с европейскими S, так и с F группами [1].

В настоящее время все данные группы

приобрели статус видов и описаны как *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) (европейская Р-группа), *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen (европейская S-группа), *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen (европейская F-группа), *Heterobasidion irregulare* (Underw.) Garbel. & Otrosina (североамериканская Р-группа) и *Heterobasidion occidentale* Otrosina & Garbel. (североамериканская S-группа) [1, 5]. Так же за последнее десятилетие выявлено 11 видов грибов в составе азиатского комплекса *Heterobasidion*, однако, в отличие от европейской и североамериканской групп, данные виды являются облигатными сапротрофами [6].

На территории Беларуси, согласно литературным данным, встречаются два вида гриба из рода *Heterobasidion*: *H. annosum* и *H. parviporum*. Характер развития данных фитопатогенных видов грибов на разных древесных породах неодинаков. *H. annosum* является наиболее агрессивным видом, способным поражать широкий спектр древесных пород: сосну обыкновенную, ель европейскую, березу повислую, березу пушистую, осину и др. *H. annosum* поражает не только корни растущих деревьев, но и способен формировать гнили древесины в нижней (на высоте до 0,3 м) части ствола. В то же время *H. parviporum* развивается только на ели и неспособен поражать другие древесные породы. Гниль, вызываемая патогеном, из корней может заходить в ствол и распространяться в нем на высоту до 8–12 м.

Важной особенностью повреждения корневой губкой еловых насаждений является скрытый характер очагов, в результате чего своевременное обнаружение данного патогена представляется затруднительным, что, в свою очередь, способствует повреждению ельников на значительных территориях [7, 8].

Два вида (*H. annosum* и *H. parviporum*) гриба распространяются как при помощи базидиоспор (первичное заражение) [9], так и через корневые контакты в результате разрастания мицелия (вторичное заражение) [10], вследствие чего повреждаются обширные территории хвойных насаждений. На тех площадях, где заражение фитопатогенными грибами из рода *Heterobasidion* установлено, может произойти заражение молодых насаждений от инфицированных корней и пней предыдуще-

го поколения деревьев при помощи корневых контактов [1, 11, 12]. Данный вид распространения корневой гнили можно избежать, используя древесную породу, являющуюся невосприимчивой для заражения определенным видом гриба корневой губки.

Таким образом, установление в очагах усыхания видовой принадлежности патогена позволяет подобрать породный состав, в наибольшей степени подходящий для проведения лесовосстановления на вырубках.

К настоящему времени видовая идентификация корневой губки основана на морфологическом анализе плодовых тел и проведении теста соматической совместимости моноспоровых культур *in vitro*. Несмотря на присутствие некоторых морфологических различий (длина волосков на верхней стороне шляпки рядом с краем плодового тела, размер пор гименофора) плодовых тел между *H. parviporum* и *H. annosum* s.s., перекрывающиеся вариации затрудняют их достоверную идентификацию и наиболее точный метод определения видовой принадлежности, на наш взгляд, возможен лишь с применением молекулярно-генетических подходов. В то же время разрабатываются и другие направления анализа данных фитопатогенов: оценка белковых спектров [13], изоферментный анализ [14], профилирование жирных кислот и стероидов (FAST) [15]. Используемые ДНК-методы также разнообразны по их методологии: произвольно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD) [16, 17], маркеры на основе секвенирования рибосомной ДНК [18], произвольно амплифицированные мини- [19] и микросателлитные маркеры (RAMS) [20]. Для некоторых видов были предложены видоспецифичные праймеры для определения видовой принадлежности патогена как в условиях чистой культуры, так и непосредственно в древесине [21, 22]. В то же время следует отметить, что эффективность диагностики с использованием данных праймеров зачастую являлась низкой и в значительной степени была обусловлена региональной приуроченностью изолятов, использованных в данных исследованиях.

В связи с вышеизложенным, задачами данного исследования являются: разработка STS-маркеров корневой губки, изучение генетического полиморфизма среди изолятов, ин-

фицирующих ель европейскую, и на основе полученных данных проведение сравнительной оценки пригодности маркеров для диагностики *H. parviporum* и *H. annosum*.

Материалы и методы

Экспериментальный материал (плодовые тела и высечки инфицированной древесины) корневой губки был собран в еловых насаждениях семи Государственных лесохозяйственных учреждений Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, а также на территории Негорельского учебно-опытного лесхоза и Национального парка «Беловежская пушча». Получение препаратов суммарной ДНК из плодовых тел осуществлялось напрямую, а для высечек древесины — напрямую или через получение чистых культур патогена [23]. Предварительная верификация культур *in vitro* корневой губки осуществлялась с использованием праймеров HetF и HetR [24].

В качестве исходного материала для разработки локус-специфичных праймеров были использованы геномные (база данных WGS) последовательности *Heterobasidion* spp., представленные в NCBI GenBank: *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1) и *H. parviporum* (учетная запись проекта PDUQ01.1). Предварительное выравнивание нуклеотидных последовательностей было произведено по следующему алгоритму: 1) ассемблированные последовательности (контиги) *H. parviporum* с помощью программного обеспечения CLC Sequence Viewer 6 были объединены в один искусственный скаффолд размером 33 193 158 н. о.; 2) с использованием онлайн ресурса SMS (Sequence Manipulation Suite) данный скаффолд был раз-

делен на 251 720 перекрывающихся (величина перекрытия — 50 н. о.) коротких фрагментов размером 250 н. о.; 3) полученные короткие фрагменты *H. parviporum* в программе Ugene v.42 были картированы на скаффолды (14 ед.) *H. annosum*, депонированные в NCBI GenBank. Далее с использованием программного обеспечения Ugene v.42 были идентифицированы участки генома, характеризующиеся сходством или отличиями между *H. annosum* и *H. parviporum*.

В качестве STS-маркеров были выбраны участки ортологичных генов *H. annosum* и *H. parviporum*. При этом последовательности места отжига праймеров для маркеров HetAll2, HetAllV3 и HetAllV4 выбирались с учетом возможности их ПЦР-амплификации у обоих видов. Основной характер изменчивости в данном случае был связан как с размером амплифицируемого продукта, так и с полиморфизмом нуклеотидной структуры фланкируемого региона для разных видов. Дизайн праймеров для ПЦР-амплификации STS-маркеров HetParv1, HetParV2, HetAnn3, HetAnV2 осуществлялся посредством выявления последовательностей, содержащих олигонуклеотидные делеции / инсерции у одного из видов, что обуславливало их применимость только по отношению к *H. parviporum* (HetParv1 и HetParV2) или *H. annosum* (HetAnn3 и HetAnV2). Перечень разработанных STS-маркеров приведен в таблице 1.

ПЦР-амплификация выполнялась с применением DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Электрофоретическое фракционирование ампликонов выполнялось в 2% агарозном геле с целью эффективного их разделения и типировки.

Таблица 1

Перечень разработанных STS-маркеров

Маркер	Нуклеотидная структура праймеров для ПЦР-амплификации	Ожидаемый размер ампликона, н. о	Локализация
HetParv1	GGCCTCATTGACCACTGACA TTTACCTGTGCGGCATCCTT	<i>H. parviporum</i> — 117 <i>H. annosum</i> — н/а*	Ген транскрипционного фактора семейства Swi5
HetAll2	GGWTCCTCCTCCACCAGACT СТААУССГТАСАТGGTGCGT	<i>H. parviporum</i> — 174 <i>H. annosum</i> — 173	Ген цистеиновой протеиназы (убиквитинилгидролазы) семейства C19
HetAnn3	CAGCCCCGATACGCAGAC AGCATCGTCTTCACGTTCTTC	<i>H. parviporum</i> — н/а <i>H. annosum</i> — 120	Ген ядерного белка семейства YL1

Окончание таблицы 1

Маркер	Нуклеотидная структура праймеров для ПЦР-амплификации	Ожидаемый размер ампликона, н. о	Локализация
HetAnV2	CGAGAGAGGGGACGGAGAT GCACGCCTGCAGTGGC	<i>H. parviporum</i> — н/а <i>H. annosum</i> — 100	Ген убиквитин связывающего фермента семейства UBСс
HetParV2	GCGAGAGAGGGGAGATG CTCCGTCAACCAGCAGT	<i>H. parviporum</i> — 106 <i>H. annosum</i> — н/а	Ген убиквитин связывающего фермента семейства UBСс
HetAllV3	TGTCSTTGACAAGTAGACAC CCCCAAGTCAAGTACAAAA	<i>H. annosum</i> — 116 <i>H. parviporum</i> — 102	Ген глутаминсинтетазы
HetAllV4	GTGCCAAGTAAGAGGTTT TTTTGAGGACGACGATACTT	<i>H. annosum</i> — 161 <i>H. parviporum</i> — 149	ОРС (ORF) с неустановленной функцией

Примечание. н/а — продукт амплификации отсутствует для *H. annosum* (NCBI CVKZ01.1) или *H. parviporum* (NCBI PDUQ01.1)

Результаты и обсуждения

В ходе молекулярно-генетической оценки изолятов был выявлен широкий спектр генетического полиморфизма, связанный с варьированием размера амплифицируемых STS-маркеров корневой губки.

Маркер *HetAll2*

Несмотря на предполагаемое относительное сходство (173 и 174 н. о.) расчетных (на основании геномных данных) размеров ампликонов среди *Heterobasidion* spp., проведенный анализ ПЦР-профилей изученных образцов показал, что они характеризовались пятью электрофоретическими вариантами, детектируемых в условиях агарозного геля. При этом выявляемые алломорфы могли формировать различные типы электрофоретических профилей среди образцов корневой губки. Электрофоретические профили образцов (дикариотический мицелий) корневой губки были представлены однофракционными спектрами, что, как правило, соответствует гомозиготным генотипам (реже — гетерозиготным); двухфракционными — относящимися к гетерозиготным генотипам; трехфракционными — имеющих дополнительные наследственные аспекты (дубликации, паралогичные локусы, химерную структуру мицелия и др.). Секвенирование альтернативных электрофоретических вариантов показало их аллельную природу — выявляемые различия связаны с делецией / инсерцией фрагментов гомологичных последовательностей (данные не приведены).

Маркеры *HetParV1* и *HetAnn3*

Изменчивость среди образцов по маркерам

HetParV1 и *HetAnn3* в основном была связана с нуклеотидной структурой мест отжига праймеров и, как следствие, возможностью получения ПЦР-продуктов. При этом размер зон амплификации совпадал с расчетным. Интенсивность окраски электрофоретических фракций среди образцов варьировала в широкой степени, что могло быть связано как с нуклеотидной изменчивостью в местах отжига праймеров, так и с различиями в концентрации исходной матрицы в препаратах нуклеиновых кислот. Особую важность данный аспект имел для образцов, полученных из древесных кернов, содержащих также суммарную ДНК и растения-хозяина и различающихся по степени зараженности корневой губкой. Для нивелирования различий в концентрациях матриц была проведена предварительная нормализация образцов по данным количественной ПЦР (универсальные праймеры *HetF* и *HetR*, протокол SYBRGreen). Однако использованный STS-маркер *Het* представляет собой локус, входящий в состав рДНК, копияность которой, по литературным данным, может варьировать в определенной степени среди штаммов и видов грибных организмов.

Маркеры *HetAnV2* и *HetParV2*

Выявляемый полиморфизм среди образцов корневой губки по маркеру *HetParV2* был связан с существенными отличиями нуклеотидных последовательностей в зоне отжига праймеров, что обуславливало наличие или отсутствие ПЦР-продукта. В то же время, для маркера *HetAnV2*, различия между образцами были аналогичны *HetParV2*, но также выявлялись и амплифицируемые варианты иного (от

расчетного) размера.

Маркер HetAllV3 и HetAllV4

Проведенный анализ образцов корневой губки по маркерам HetAllV3 и HetAllV4 показал наличие продуктов амплификации для всех изученных изолятов (рис. 1). Выявляемый полиморфизм был связан с изменением размеров локусов и соответствовал расчетным значениям, полученным на основании анализа геномных данных *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1) и *H. parviporum* (учетная запись проекта PDUQ01.1).

В целом на основании проведенного исследования была составлена сводная таблица результатов диагностики для 26 образцов корневой губки как по морфологическим, так и по молекулярно-генетическим признакам (табл. 2). Как следует из таблицы 2, для разработанных видоспецифических (применительно к *H. parviporum* и *H. annosum*) праймеров не было выявлено абсолютной взаимосвязи между результатами ПЦР-амплификации. Так, наибольшее значение коэффициента корреляции (0,75) было выявлено для маркеров HetParV1 и HetParV2, разработанных на основе геномных данных *H. parviporum* (учетная запись PDUQ01.1) и локализованных в различных скаффолдах (хромосомах) гриба. Значения коэффициентов корреляции для пар HetAnn3 и HetParV2, HetAnV2 и HetParV2 не превысили 0,57 и 0,48 соответственно, что указывает на отсутствие общей направленности результатов диагностики. Наименьшее значение коэффициента корреляции (0,04) было отмечено для маркеров

HetAnn3 и HetAnV2, для дизайна праймеров которых были использованы нуклеотидные последовательности *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1).

Наибольший уровень сходства результатов диагностики был выявлен для универсальных (по отношению к *H. parviporum* и *H. annosum*) маркеров HetAllV3 и HetAllV4, несмотря на их различное происхождение, функции и хромосомную локализацию. Значение коэффициента корреляции для изученных образцов составило 1. Высокая конкордантность молекулярно-генетических признаков была также выявлена между парами маркеров HetAllV3 и HetParV2 — 0,92, HetAllV4 и HetParV2 — 0,92, HetParV1 и HetParV2 — 0,78, HetAllV3 и HetParV1 — 0,72, HetAllV4 и HetParV1 — 0,72.

Проведенный сравнительный анализ данных, полученных по полиморфному маркеру HetAll2, не позволил выявить закономерностей формирования генетического и генотипического разнообразия в сопоставлении с изученными морфологическими признаками и данными, полученными с использованием других маркеров.

Полученные результаты кросс-амплификации видоспецифических маркеров могут быть объяснены как индивидуальным характером изменчивости, диагностируемой у депозитов *H. parviporum* или *H. annosum* NCBI GenBank, так и, предположительно, наличием процессов интрогрессивной гибридизации между *H. parviporum* и *H. annosum* и, как следствие, формированием различных вариантов межвидовых гибридов.

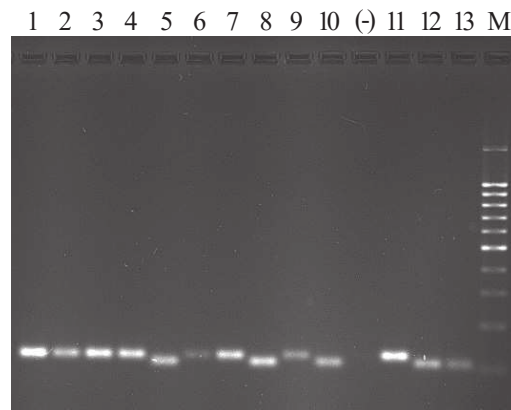


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов изолятов *Heterobasidion* spp. (праймеры HetAllV3F и HetAllV3R) Образцы: 1 — 1-11; 2 — 1-12; 3 — 1-13; 4 — 1-14; 5 — 2-3; 6 — 1-6; 7 — 2-5.3; 8 — 2-2; 9 — 2-9.2; 10 — 2-1; 11 — отриц. контроль; 11 — 2-9.6; 12 — 1-1; 13 — 1-2; M — маркер молекулярного веса

Результаты молекулярно-генетической оценки образцов *Heterobasidion* spp.

Изолят	Место сбора	Тип образца	Тип гименофора	Опушение	HetAll2, п. н.	HetAnn3, п. н.	HetAnV2, п. н.	HetParV1, п. н.	HetParV2, п. н.	HetAllV3, п. н.	HetAllV4, п. н.
1-1	Беловежская пуца	П	м	+	130	–	–	117	106	102	149
1-2	Беловежская пуца	П	м	+	153	120	–	117	106	102	149
1-3	Негорельский уч. опыт. лесхоз	К			142/153/170	120	100	–	–	116	161
1-5	Полоцкий лесхоз	П	м	+/-	130	120	–	117	106	102	149
1-6	Узденский лесхоз	К			153/161	120*	100	–	–	116	116
1-7	Оршанский лесхоз	П	м	+	130	–	–	117	106	102	149
1-8	Узденский лесхоз	К			142/153/170	120	100	117*	–	116	161
1-9	Узденский лесхоз	К			142	–	100	–	–	116	116
1-10	Ивьевский лесхоз	П	м	+	130/161	120	–	117	106	102	149
1-11	Узденский лесхоз	К			153/161	120	100	117*	–	116	161
1-12	Узденский лесхоз	К			130/153/170	120	100	117	106*	116	161
1-13	Барановичский лесхоз	П	к	–	142/153/161	120	100	117	–	116	161
1-14	Барановичский лесхоз	П	к	–	130/153	120	100	–	–	116	161
2-1	Полоцкий лесхоз	П	м	+/-	153/161/170	120*	100	117	106	102	149

Окончание таблицы 2

Изолят	Место сбора	Тип образца	Тип гименофора	Опушение	HetAll2, п. н.	HetAnn3, п. н.	HetAnV2, п. н.	HetParV1, п. н.	HetParV2, п. н.	HetAllV3, п. н.	HetAllV4, п. н.
2-2	Ивьевский лесхоз	П	м	+	142/161	–	100	117	106	102	149
2-3	Ивьевский лесхоз	П	м	+	142/161	120*	100	117	106	102	149
2-4	Стародорожский опыт. лесхоз	П	к	–	153/161	120	80	–	–	116	161
2-5.1	Оршанский лесхоз	П	м	+	142	–	100	117	106	102	149
2-5.3	Оршанский лесхоз	П	к	–	161	120	80	117	–	116	161
2-7.1	Боровлянский спецлесхоз	П	ср	+/-	142/161	120*	100	117	106	102	149
2-7.2	Боровлянский спецлесхоз	П	м	+	142/161	–	100	117	106	102	149
2-7.3	Боровлянский спецлесхоз	П	к	–	153/161	120	80	–	–	116	161
2-7.4	Боровлянский спецлесхоз	П	м	+/-	142	–	100	117	106	102	149
2-8.1	Беловежская пуца	П	м	+	161	120*	100	117	106	102	149
2-9.2	Барановичский лесхоз	П	ср	–	153/161	120*	80	–	–	116	161
2-9.6	Барановичский лесхоз	П	к	–	153/161	120*	80	117	–	116	161

Примечание. Тип образца: П — плодовое тело, К — kern. Тип гименофора: к — крупнопоровый, ср — среднепоровый, м — мелкопоровый. Маркеры: * — слабая окраска ампликонов. Цветом обозначены ячейки, значения морфологических или молекулярных признаков в которых в наибольшей степени соответствуют *H. parviorum*

Заключение

Исходя из полученных результатов, видно, что межвидовые отличия между изолятами в равной степени обусловлены как вариациями в нуклеотидных последовательностях маркеров, так и внутривидовыми перестройками. На основании проведенной комплексной диагностики маркеры HetA1V3 и HetA1V4 рекомендованы для проведения молекулярно-генетической диагностики *H. parviporum* и *H. annosum*.

Работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ Б22М-055.

Список использованных источников

1. Niemelä, T. Taxonomy of the genus *Heterobasidion* / T. Niemelä, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 2. – P. 27–33.
2. Mitchelson, K. Diagnosis and differentiation of intersterility groups / K. Mitchelson, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 5. – P. 71–92.
3. Федоров, Н. И. Ферментативная активность разных штаммов корневой губки / Н. И. Федоров, Н. И. Стайченко, Л. М. Неустроева // *Микология и фитопатология*. – 1975. – Т. 9, № 3. – С. 235–239.
4. Korhonen, K. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* / K. Korhonen // *Commun. Inst. For. Fenn.* – 1978. – Vol. 94, № 6. – 25 p.
5. Otrosina, W. J. *Heterobasidion occidentale* sp. nov. and *Heterobasidion irregulare* nom. nov.: a disposition of North American *Heterobasidion* biological species / W. J. Otrosina, M. Garbelotto // *Fungal Biol.* – 2010. – Vol. 114. – P. 16–25.
6. Yuan Y. et al. An updated global species diversity and phylogeny in the forest pathogenic genus *Heterobasidion* (*Basidiomycota*, *Russulales*) // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Т. 11.
7. Житникова, М. В. Состав и распространение интерстерильных групп корневой губки в лесных насаждениях Беларуси / М. В. Житникова, Н. И. Федоров // *Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах: материалы международной научной конференции*, Минск, 20–24 сент. 2004 г. / Ин-т эксперим. ботаники им. В.Ф. Купревича ; ред.-кол.: О. С. Гапиенко [и др.]. – Минск, 2004. – С. 100–103.
8. Федоров, Н. И. Корневые гнили хвойных пород в лесах Беларуси / Н. И. Федоров // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр.* – Гомель : Ин-т леса НАН Беларуси, 2001. – Вып. 53. – С. 342–345.
9. Федоров Н. и др. Исследование прорастания базидиоспор корневой губки. – 1978.
10. Stenlid J. Regional differentiation in *Heterobasidion annosum* // 8. International Conference on Root and Butt Rots, Uppsala (Sweden), 9–16 Aug 1993. – *Sveriges Lantbruksuniv.*, 1994.
11. Piri T., Korhonen K. Infection of advance regeneration of Norway spruce by *Heterobasidion parviporum* // *Canadian journal of forest research*. – 2001. – Т. 31, № 6. – С. 937–942.
12. Gunulf A. et al. Secondary spread of *Heterobasidion parviporum* from small Norway spruce stumps to adjacent trees // *Forest Ecology and Management*. – 2013. – Т. 287. – С. 1–8.
13. Mitchelson, K. Diagnosis and differentiation of intersterility groups / K. Mitchelson, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 5. – P. 71–92.
14. Karlsson, J.-O. Pectic isozyme profiles of Intersterility groups in *Heterobasidion annosum* / J.-O. Karlsson, J. Stenlid // *Mycol. Res.* – 1991. – Vol. 95, № 5. – P. 531–536.
15. Combined fatty acid and sterol profiles of *Heterobasidion annosum* intersterility groups S, P and F / M. M. Müller [et al.] // *Mycol. Res.* – 1995. – Vol. 99, № 9. – P. 1 025–1 033.
16. Differentiation of intersterility groups and geographic provenances among isolates of *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNA assays / M. Garbelotto [et al.] // *Can. J. Bot.* – 1993. – Vol. 71, № 4. – P. 565–569.
17. Fabritius, A.-L. Variation in *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNAs / A.-L. Fabritius, R. Karjalainen // *Eur. J. For. Path.* – 1993. – Vol. 23, № 4. – P. 193–200.
18. *Heterobasidion annosum* 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism / T. Kasuga [et al.] // *Current Genetics*. –

1993. – Vol. 24. – P. 433–436.

19. Stenlid, J. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA / J. Stenlid, J.-O. Karlsson, N. Högberg // *Mycol. Res.* – 1994. – Vol. 98. – P. 57–63.

20. Vainio, E. J. Variation of RAMS markers within the Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in Europe / E. J. Vainio, J. Hantula // *Eur. J. For. Pathol.* – 1999. – Vol. 29, № 3. – P. 231–246.

21. Hantula, J. Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s. str.) and *H. parviporum* infected stumps in Northern Europe / J. Hantula, E. Vainio // *Silva Fennica.* – 2003. – Vol. 37, № 2. – P. 181–187.

22. Šķipars, V. Detection of *Heterobasidion*

annosum in Scots pine trees using a polymerase chain reaction based methods / V. Šķipars, D. Ruņģis // *Baltic Forestry.* – 2011. – Vol. 17, № 1. – P. 2–7.

23. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

24. Острикова, М. Я. Оценка зараженности почв корневой губкой на лесокультурных площадях / М. Я. Острикова // *Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси – Гомель, 2011. – Вып. 71: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 480–488.*

A. M. Nestyuk¹, S. V. Pantelev², V. A. Yarmolovich¹, O. Yu. Baranov^{1,3}

STUDYING OF THE STS-MARKERS POLYMORPHISM IN HETEROBASIDION ISOLATES INFECTING NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) H.KARST.) IN BELARUS

¹Belarusian State Technological University,
13a Sverdlova St., 220006 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

²Institute of Forests, National Academy of Sciences of Belarus,
71 Proletarian St., 246050 Gomel, Republic of Belarus

³Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus
66 Independence Ave., 220072 Minsk, Republic of Belarus

The article presents the results of studying the genetic polymorphism of *Heterobasidion* (root rot agent) isolates that infect Norway spruce (*Picea abies*) in various regions of Belarus. Based on the data obtained, a comparative assessment of the suitability of STS markers for species diagnostics of fungal isolates (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) and *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen) was carried out. Samples of the sporocarp and infected wood were collected in Norway spruce stands on the territory of three geobotanical subzones — in seven forestry enterprises of the Ministry of Forestry of the Republic of Belarus, on the territory of the Negorelsky educational and experimental forestry and the National Park "Belovezhskaya Pushcha". Based on the comprehensive analysis of the samples, markers for specific molecular genetic diagnosis of *H. annosum* and *H. parviporum* were recommended.

Keywords: root rot fungi, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., species identification, molecular genetic analysis, STS markers.

Дата поступления в редакцию: 01 сентября 2022 г.