

УДК 632.4:630*845.52:630*232.322.44

UDC 632.4:630*845.52:630*232.322.44

**ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ
ПРОФИЛАКТИКИ ПИРИКУЛЯРИОЗА
В РИСОВЫХ СЕВООБОРОТАХ**

**CURRENT STATUS AND POTENTIAL OF
BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR
RICE BLAST DISEASE IN THE RICE
CULTIVATION TECHNOLOGY**

Петенко Александр Иванович
д.с.-х.н., профессор

Petenko Aleksandr Ivanovich
Dr.Sci.Agr., professor

Волкова Светлана Андреевна
к.б.н.
Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия

Volkova Svetlana Andreevna
Cand.Biol.Sci., associate professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Пирикуляриоз риса, вызываемый *Pyricularia oryzae*, – главное заболевание, влияющее на продуктивный рост суходольного и орошаемого риса. Применение биотехнологических подходов для защиты от заболеваний может быть альтернативной стратегией химическому контролю

Rice blast caused by *Pyricularia oryzae* is a major disease affecting rice production grown in upland and wetland rice. Application of biotechnological approach to protect against the disease may be an alternative strategy to chemical control

Ключевые слова: ПИРИКУЛЯРИОЗ РИСА, *MAGNAPORTHE ORYZAE (HERBERT) BARR*, *PYRICULARIA ORYZAE CAV.*, УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ, РИС, БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Keywords: RICE BLAST, *MAGNAPORTHE ORYZAE (HERBERT) BARR*, *PYRICULARIA ORYZAE CAV.*, BLAST RESISTANCE, RICE, BIOLOGICAL CONTROL

Рис – одна из важнейших сельскохозяйственных культур. Его зерном питаются более трёх миллионов человек [1]. Скученность и однотипность возделываемых растений агробиоценоза привели к возникновению новых и весьма благоприятных условий для питания, размножения и специализации в процессе филогенеза различных видов фитопатогенов и, в конечном счёте, к значительным изменениям в составе вредоносных грибковых болезней сельскохозяйственных культур. Грибы – неотъемлемая часть биосферы нашей планеты и важный объект народно-хозяйственного значения. С одной стороны, грибы используются в пищу человеком и для изготовления лекарственных препаратов, а с другой – являются возбудителями заболеваний человека и животных, причиной аллергических реакций, потенциальными биологическими ядами, но наибольший ущерб наносят грибы как фитопатогены. В агротехнологической практике грибы могут выступать и как опасные

вредители, и как средство решение защиты от фитопатогенов, а также способ повышения плодородия почвы.

Для поддержания пищевых потребностей непрерывно растущей глобальной популяции урожай риса должен удвоиться в следующие 40 лет, для чего необходимо максимально сократить потери. От 10 % до 30 % урожая риса ежегодно теряется из-за поражения пирикуляриозным грибом *Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr [1]. Помимо риса, данный патоген вирулентен для более восьмидесяти видов культурных и дикорастущих растений. В своём развитии *M. oryzae* проходит вегетативную стадию (*Pyricularia oryzae* Cav.), представленную мицелием и конидиями, и совершенную сумчатую стадию (*Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr), наличие которых привело к использованию двух названий для обозначения этого возбудителя [2]. Несмотря на мощное развитие агрохимической индустрии, возможности её далеко не беспредельны. Причём использование химических средств защиты растений приводит к химическому загрязнению окружающей среды (в частности загрязнению фунгицидами). Настоящее требует более тонкого и бережного подхода к использованию природных ресурсов, в том числе и в земледелии. Для этого, в соответствии с закономерностями развития агроэкосистем, должны измениться стратегия и тактика не только защиты растений, но и всей растениеводческой практики. Использование биотехнологических подходов к защите сельскохозяйственных растений позволяет получать безопасный продукт с меньшими затратами.

Биоконтроль – это альтернативный практический и экономический подход к борьбе с заболеваниями растений. В качестве альтернативы химическим средствам защиты биотехнология может предложить следующие решения: ускорение селекции устойчивых сортов с помощью MAS («маркерные технологии»); создание трансгенных, устойчивых к пирикуляриозу сортов риса; применение живых-форм антагонистов против

грибных заболеваний; применение фунгицидов биологического происхождения; вытеснение *Pyricularia oryzae* из агроценоза, путём введения конкурентов или уничтожения источников заражения биологическими способами.

В практике молекулярной биотехнологии применяют несколько подходов к конструированию устойчивости риса к пирикулярриозу. Понимание того, будет ли такая устойчивость долговременной и эффективной в полевых условиях против разнообразных изолятов все ещё может появиться только после основательных исследований. Существующие трансгенные подходы можно классифицировать по пяти основным направлениям. Во-первых, подходы, которые используют компоненты путей иммунитета растения, например экспрессию доминантных специфичных к изоляту генов устойчивости риса, таких как *Pi-ta* и *Pi-d2*, или генов устойчивости широкого спектра действия, таких как *Pi9*. Во-вторых, сверхэкспрессию генов, связанных с защитной системой растения, таких как PR-хитиназы и b-1,3-глюконазы. В-третьих, усиление устойчивости к пирикулярриозу у трансгенного риса с недостаточным синтезом линоленовой кислоты. В-четвертых, высокая индуцируемая патогеном экспрессия ключевого гена биосинтеза жасминовой кислоты. В-пятых, усиление устойчивости к пирикулярриозу трансгенного риса со сверхэкспрессией фактора транскрипции WRKY45, который служит связующим звеном защитной сигнальной системы. В-шестых, подходы, использующие микробные гены, которые вызывают неспецифический защитную реакцию у риса, к примеру, трансгенный рис несущий гены белков бактериальных жгутиков *Acidovorax avenae* уменьшающий повреждение пирикулярриозом или экспрессирующий ген кодирующий белок гарпин из *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. В-седьмых применение прямой фунгицидной активности растительных и нерастительных трансгенов, которые придают устойчивость растениям

только после патогенного стимула, например полученный из бабочки синтетический цекропин А или антимикробные пептиды [3].

Гораздо более изученной и широко используемой, в том числе в селекции устойчивого риса, является маркерная селекция. Использование маркеров – "сигналий", изменчивость которых связана с признаками, важными для селекционеров, началось еще с работ А.С. Серебровского (1926). Генетические маркёры (метчики, фактор идентификации), чётко фенотипически проявляющиеся менделирующие признаки, которые сопряжены с изменчивостью другого, качественного или количественного признака, применялись в селекции в случае, если изучаемый ген кодирует качественный признак с неполной пенетрантностью или сопряжён с количественным признаком, а также в случае неявного проявления гена. Отбирая в потомстве генотипы с маркёром, можно с определённой вероятностью ожидать, что они унаследуют признак, по которому ведётся селекция. Биотехнологические методы позволили перевести маркерную селекцию на качественно новый уровень и оценивать не весь комплекс химических субстанций, вплоть до веществ вторичного происхождения, а первичные продукты генов (белковый полиморфизм), а в настоящий момент, собственно, генетический материал клетки (полиморфизм ДНК). В настоящий момент, полное секвенирование генома возбудителя пирикуляриоза позволяет сопровождать селекцию, направленную на создание сортов, как с «вертикальной» (расоспецифической), так и с «горизонтальной» (нерасоспецифической) [4], [2], [5].

Современная маркерная селекция располагает следующими клонированными генами устойчивости (R генами): *Pi-b*, *Pi-ta*, *Pi9*, *Pi2* (*Piz-5*), *Piz-t*, *Pi-d2*, *Pi33²*, *Pi36*, *Pi37*, *Pi-CO39(t)*, *Pi40*, *Pik^h*, *pi21*. Эти гены позволяют создавать сорта как с расоспецифической, так и с нерасоспецифической устойчивостью. Хорошо изучены следующие гены

авирулентности: *AVR-Pita1* и/или *AVR-Pita2*, *ACE1*, *AVR1-CO39* и *PWL1/PWL2*, что позволяет быстро и эффективно контролировать состояние популяции патогена, а также отбирать его авирулентные линии [6]. В отечественных селекционных организациях (ВНИИ риса, ВНИИЗК) ведётся программа создания отечественных сортов риса с высоким потенциалом урожайности и длительной устойчивостью к пирикуляриозу, предусматривающая объединение эффективных генов устойчивости к этому патогену. Например, в сорт Снежинка введены гены *pi-ta*, *pi-b*, *pi-z*, на сортоиспытании находятся аналог сортов Боярин и Вираж, несущий объединённые гены *Pi-2* или *Pi-1+Pi-33* в одном генотипе: (*Pi-2* х Вираж) х (*Pi-1+33* х Боярин) и сорт Магнат (*Pi1* и *Pi2*) [4; 5; 7–9].

Современная биотехнология предлагает вместо синтетических пестицидов препараты биологического происхождения. Биопестициды лишены традиционных проблем, связанных с применением химических фунгицидов, которые являются ксенобиотиками, загрязняющими окружающую среду, сельскохозяйственную продукцию и представляющими опасность для здоровья человека и животных; способствуют возникновению резистентных к ним форм патогенов и вредителей. Биологические фунгициды могут быть продуктами метаболизма грибов, растений и бактерий.

Обширные исследования показали, что различные типы микробов потенциально способны заменить неорганические химические соединения (удобрения и пестициды), которые применяются на полях в широких масштабах.

Продуцирование вторичных метаболитов, таких как антибиотики, Fe-хелатные сиферофоры, и цианиды, чаще всего, бывают характерны для подавления роста грибов флуоресцентными псевдомонадами в ризосфере некоторых зерновых [10].

В качестве биофунгицидов, выделяемых из грибов, используются также препараты «непрямого действия» – ингибиторы биосинтеза стероидов в растительных тканях. Некоторые патогенные грибы (напр. оомицеты (сем. *Phythiaceae*)) не способны синтезировать необходимые для своего развития стероиды и (или) их предшественники и получают стероиды из растительных тканей, таким образом, нарушение синтеза фитостероидов приводит к нарушению жизненного цикла фитопатогенов. Статины – эффективные и высокоспецифичные ингибиторы стероидов, которые являются продуктами вторичного метаболизма грибов. Рядом авторов к применению предлагаются такие вещества, как компактен (продуцент *Aspergillus terreus*) и ловастатин (продуцент *Penicillium citrinum* (Thom)), обладающие широким спектром воздействия как на грибные патогены, так и на насекомых и вирусы [11], [12]. В целом использование веществ биологического происхождения является более безопасным для окружающей среды методом защиты растений от патогенов и вредителей, позволяющим преодолеть некоторые нежелательные последствия химического метода.

Известно, что некоторые из микробиологических агентов эффективны как биологическая защита от болезней растений. К ним относятся представители таких родов, как *Bacillus*, *Bdellovibrio*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, и *Trichoderma* [13], [14]. Большинство исследований антагонизма *Bacillus* проводились на *B. subtilis* и *B. cereus*, и реже на *B. firmus* [15]. Несколькими исследователями изучена биологическая борьба с пирикулярриозом риса с использованием живых форм антагонистов, к примеру, с использованием авирулентных изолятов *M. oryzae* [16], грибного патогена пшеницы и ячменя *Bipolaris sorokiniana* [17] и гриба *Exserohilum monoceras* [18]. Также показано подавление заражения *M. oryzae* грибным изолятом МКР5111В, выделенным из микрофлоры поверхности листа риса, предполагается, что эта

индуцированная устойчивость обеспечит защиту от пирикулярриоза риса [19]. Ряд работ описывают применение антагонистических бактерий для борьбы с *M. oryzae*: штаммы *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus polymyxa* [20], *Bacillus licheniformis* [21]] и *Streptomyces sp. PM5* [22] данные испытания проводились на проростках или в условиях теплицы. В полевых исследованиях подтверждена эффективность как живых форм, так и культуральной жидкости и лизата *Staphylococcus sp. LZ16* [23].

Биологическая борьба с пирикулярриозом риса приоритетная, недорогая и экологически приемлемая технология, по сравнению с применением фунгицидов. Однако её эффективность ещё не доказана в широкомасштабных, длительных полевых испытаниях. Более того, уязвимость биологических агентов к флуктуациям окружающей среды ставят под угрозу ее эффективность. Успех биоконтроля может зависеть от подходящей рецептуры, так же как и от жизнеспособности микробиологических агентов. Окончательно перспективные биологические агенты должны быть оценены по их влиянию на заболевание на фоне местной флоры и с гарантией того, что распределение авирулентных штаммов не приведёт к вирулентным мутациям [3].

Таким образом, в Краснодарском крае, с точки зрения возможностей решений, наиболее близких к внедрению, способных повысить эффективность отрасли рисоводства улучшить фитосанитарную обстановку и экологическую безопасность рисовых севооборотов, следует выделить производство биопрепаратов на базе сформированных в регионе мощностей, в том числе за счёт малых инновационных предприятий Кубанского аграрного университета ООО «Экспериментальная биофабрика» и ООО «Биориджин». Эти производства и наличие аналитического оборудования для осуществления микробиологического мониторинга на базе кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики КубГАУ, а также научного потенциала партнёрских научно-

производственных структур могут явиться достаточно прочной основой для упрощения решения проблем профилактики грибных болезней при производстве экологически безопасного риса на Кубани.

Уже имеющиеся и планируемые научно-технические разработки помогут при решении поставленных задач наладить биодеструкцию рисовых пожнивных остатков (стерня и солома) грибами антагонистами возбудителя пирикулярриоза с выраженными ферментативными и фунгицидными свойствами. Кроме того, должно быть налажено производство и использование биоорганических удобрений на основе отходов растениеводства (кроме рисовых) и животноводства в форме биокомпоста, полученного на основе переработки этих отходов полезными штаммами грибов и бактериальных ассоциаций культур микроорганизмов, способных профилактить патогенные грибные инфекции и повышать плодородие почвы.

Список литературы

1. Мухина Ж.М. и др. Изучение биоразнообразия возбудителя пирикулярриоза риса молекулярно-генетическими методами // Труды кубанского государственного аграрного университета. 2008. № 14. С. 112–114.
2. Мухина Ж.М. и др. Изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr с использованием методов молекулярного маркирования. Методические рекомендации Российская академия сельскохозяйственных наук всероссийский научно-исследовательский институт р. , 2007. Вып. Методическ.
3. Skamnioti P., Gurr S.J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. // Trends Biotechnol. 2009. Т. 27. № 3. С. 141–50.
4. Костылев П.И. и др. Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с помощью ДНК-маркеров // № 1. С. 26–28.
5. Костылев П.И. и др. Гриб *Magnaporthe grisea* – возбудитель пирикулярриоза риса и перенос генов устойчивости к нему методом маркерной селекции, " Ботаника и природное многообразие растительного мира С. 97–102.
6. Soubabere O. и др. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* // Mol. Ecol. Notes. 2001. Т. 1, № 1–2. С. 19–21.
7. Ковалев В.С. и др. Генотипирование российских сортов риса микросателлитными маркерами // № 2. С. 32–35.
8. Зеленский Г.Л. Борьба с пирикулярриозом риса путём создания устойчивых сортов: монография. Вып. КубГАУ.
9. Зеленский Г.Л. Итоги 30-летней работы по селекции сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу в России С. 427–440.

10. Howell C.R., Stipanovic R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With an Antibiotic Produced by the Bacterium // *Phytopathol.* 1978. Т. 69. № 5. С. 480–482.
11. Украинцева С.Н., Приданников М.В., Джавахия В.Г. Компактин - потенциальный биопестицид // № 2. С. 64.
12. Джавахия В.Г., Петелина М.В. Влияние ловастатинона на фитопатогенные грибы // Т. 4-6. С. 33–35.
13. Fravel D.R. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1988. Т. 26. № 1. С. 75–91.
14. Асатурова А. М. . Физиологические признаки перспективных штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* – продуцентов микробиопрепаратов // Маслиничные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2009. Т. 2. № 141.
15. Suryadi Y. и др. Management of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) using formulated bacterial consortium // 2013. Т. 25. № 5. С. 349–357.
16. Ashizawa T., Zenbayashi K., Sonoda R. Effects of preinoculation with an avirulent isolate of *Pyricularia grisea* on infection and development of leaf blast lesions caused by virulent isolates on near-isogenic lines of Sasanishiki rice // *J. Gen. Plant Pathol.* 2005. Т. 71. № 5. С. 345–350.
17. Manandhar H.K. и др. Suppression of Rice Blast by Preinoculation with Avirulent *Pyricularia oryzae* and the Nonrice Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. // *Phytopathology.* 1998. Т. 88. № 7. С. 735–9.
18. Tsukamoto H. и др. Biological control of rice leaf blast with *Exserohilum monoceras*, a pathogen of *Echinochloa* species // *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1999. Т. 65. С. 543–548.
19. Ohtaka N., Kawamata H., Narisawa K. Suppression of rice blast using freeze-killed mycelia of biocontrol fungal candidate MKP5111B // *J. Gen. Plant Pathol.* 2008. Т. 74. № 2. С. 101–108.
20. Karthikeyan V., Gnanamanickam S.S. Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains // *Crop Prot.* 2008. Т. 27. № 2. С. 263–267.
21. Tendulkar S.R. и др. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* {BC98}, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea* // *J. Appl. Microbiol.* 2007. Т. 103. № 6. С. 2331–2339.
22. Prabavathy V.R., Mathivanan N., Murugesan K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces sp. PM5* // *Biol. Control.* 2006. Т. 39. № 3. С. 313–319.
23. Yu Q. и др. Characterization and evaluation of *Staphylococcus sp.* strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae* // *Biol. Control.* 2013. Т. 65. № 3. С. 338–347.

References

1. Muhina Zh.M. i dr. Izuchenie bioraznoobrazija vzbuditelja pirikuljarioza risa molekularno-geneticheskimi metodami // *Trudy kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2008. № 14. S. 112–114.
2. Muhina Zh.M. i dr. Izuchenie bioraznoobrazija fitopatogenного гриба *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr s ispol'zovaniem metodov molekularnogo markirovanija. Metodicheskie rekomendacii Rossijskaja akademija sel'skohozjajstvennyh nauk vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut r. , 2007. Vyp. Metodichesk.
3. Skamnioti P., Gurr S.J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. // *Trends Biotechnol.* 2009. Т. 27. № 3. S. 141–50.

4. Kostylev P.I. i dr. Sozdanie ustojchivyh k pirikuljariozu sortov risa s pomoshh'ju DNK-markerov // № 1. S. 26–28.
5. Kostylev P.I. i dr. Grib *Magnaporthe grisea* – vozбудitel' pirikuljarioza risa i perenos genov ustojchivosti k nemu metodom markernoj selekcii," *Botanika i prirodnoe mnogoobrazie rastitel'nogo mira* S. 97–102.
6. Soubabere O. i dr. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* // *Mol. Ecol. Notes*. 2001. T. 1. № 1-2. S. 19–21.
7. Kovalev V.S. i dr. Genotipirovanie rossijskih sortov risa mikrosatellitnymi markerami // № 2. S. 32–35.
8. Zelenskij G.L. Bor'ba s pirikuljariozom risa putjom sozdaniya ustojchivyh sortov: monografija. Vyp. KubGAU.
9. Zelenskij G.L. Itogi 30-letnej raboty po selekcii sortov risa, ustojchivyh k pirikuljariozu v Rossii S. 427–440.
10. Howell C.R., Stipanovic R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With an Antibiotic Produced by the Bacterium // *Phytopathol.* 1978. T. 69. № 5. S. 480–482.
11. Ukraineva S.N., Pridannikov M.V., Dzhavahija V.G. Kompaktin -potencial'nyj biopesticid // № 2. S. 64.
12. Dzhavahija V.G., Petelina M.V. Vlijanie lovastatina na fitopatogennye griby // T. 4-6. S. 33–35.
13. Fravel D.R. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1988. T. 26. № 1. S. 75–91.
14. Asaturova A. M. . Fiziologicheskie priznaki perspektivnyh shtammov bakterij rodov *Bacillus* i *Pseudomonas* – producentov mikrobiopreparatov // *Maslinichnye kul'tury. Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur.* 2009. T. 2. № 141.
15. Suryadi Y. i dr. Management of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) using formulated bacterial consortium // 2013. T. 25. № 5. S. 349–357.
16. Ashizawa T., Zenbayashi K., Sonoda R. Effects of preinoculation with an avirulent isolate of *Pyricularia grisea* on infection and development of leaf blast lesions caused by virulent isolates on near-isogenic lines of Sasanishiki rice // *J. Gen. Plant Pathol.* 2005. T. 71. № 5. S. 345–350.
17. Manandhar H.K. i dr. Suppression of Rice Blast by Preinoculation with Avirulent *Pyricularia oryzae* and the Nonrice Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. // *Phytopathology.* 1998. T. 88. № 7. S. 735–9.
18. Tsukamoto H. i dr. Biological control of rice leaf blast with *Exserohilum monoceras*, a pathogen of *Echinochloa* species // *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1999. T. 65. S. 543–548.
19. Ohtaka N., Kawamata H., Narisawa K. Suppression of rice blast using freeze-killed mycelia of biocontrol fungal candidate MKP5111B // *J. Gen. Plant Pathol.* 2008. T. 74. № 2. S. 101–108.
20. Karthikeyan V., Gnanamanickam S.S. Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains // *Crop Prot.* 2008. T. 27. № 2. S. 263–267.
21. Tendulkar S.R. i dr. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* {BC98}, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea* // *J. Appl. Microbiol.* 2007. T. 103. № 6. S. 2331–2339.
22. Prabavathy V.R., Mathivanan N., Murugesan K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5 // *Biol. Control.* 2006. T. 39. № 3. S. 313–319.

23. Yu Q. i dr. Characterization and evaluation of *Staphylococcus* sp. strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae* // *Biol. Control*. 2013. T. 65. № 3. S. 338–347.