

УДК 57.083.18:572.2:633.18

UDC 57.083.18:572.2:633.18

06.01.05 - Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений (сельскохозяйственные науки)

06.01.05 - Selection and seed production of agricultural plants (agricultural sciences)

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕНА PYRICULARIA ORIZAE SAV. И ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ В РИСОСЕЮЩИХ РАЙОНАХ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ<sup>1</sup>**

**IDENTIFICATION OF PYRICULARIA ORIZAE SAV. PATHOGEN AND REVEALING EFFECTIVE RESISTANCE GENES IN RICE GROWING DISTRICTS OF THE KRASNODAR REGION**

Брагина Олеся Анатольевна  
канд. биол. наук  
РИНЦ SPIN код:1661-0222  
ID: 52201334808  
[Olesya.bragina.1984@mail.ru](mailto:Olesya.bragina.1984@mail.ru)

Bragina Olesya Anatolievna  
Cand.Biol.Sci.  
RSCI SPIN-code: 1661-0222  
ID: 52201334808  
[Olesya.bragina.1984@mail.ru](mailto:Olesya.bragina.1984@mail.ru)

Оглы Андрей Михайлович  
научный сотрудник  
РИНЦ SPIN код:7769-4334  
[ogly-a@mail.ru](mailto:ogly-a@mail.ru)

Ogly Andrei Mikhailovich  
Researcher  
RSCI SPIN-code:7769-4334  
[ogly-a@mail.ru](mailto:ogly-a@mail.ru)

Малюченко Евгения Александровна  
канд. биол. наук  
РИНЦ SPIN код:3582-9511  
[malyuchenko.evgeniya@mail.ru](mailto:malyuchenko.evgeniya@mail.ru)

Malyuchenko Evgenia Aleksandrovna  
Cand.Sci.Biol.  
RSCI SPIN-code: 582-9511  
[malyuchenko.evgeniya@mail.ru](mailto:malyuchenko.evgeniya@mail.ru)

Хачмамук Пшемаф Нурбиевич  
к.с.-х.н  
РИНЦ SPIN код:4956-5597  
[89615866919@mail.ru](mailto:89615866919@mail.ru)

Khachmamuk Pshemaf Nurbievich  
Cand.Agr.Sci.  
RSCI SPIN-code: 4956-5597  
[89615866919@mail.ru](mailto:89615866919@mail.ru)

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса», 350901, Российская Федерация, г. Краснодар, Россия*

*Federal State Budgetary Institution "All-Russian Research Institute of Rice", Belozerny, Krasnodar, Russia*

В статье представлены результаты исследований по изучению внутривидовой структуры популяции возбудителя пирикулярриоза с помощью наборов сортов – тестеров Международного института риса IRRI. Дифференциация популяции гриба на сортах-тестерах является наиболее прогрессивной, так как позволяет определить генотипы вирулентности рас патогенов и идентифицировать эффективные к ним гены устойчивости растений риса. В работе изучено разнообразие возбудителя пирикулярриоза на районированных сортах риса по морфолого-культуральным признакам. В настоящее время в мире устойчивость растений риса к пирикулярриозу становится одним из важных показателей конкурентоспособности сортов. Основой для успешной селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу является наличие исходного материала с достаточно широким спектром и высоким уровнем устойчивости. Отбор

The article presents results of studies on the intraspecific structure of the population of blast causative agent using sets of tester varieties from International Rice Research Institute - IRRI. The differentiation of the fungus population on tester varieties is the most progressive, since it allows one to determine the virulence genotypes of races of pathogens and identify the resistance genes of rice plants effective for them. The work has studied the diversity of blast causative agent in released rice varieties by morphological and cultural traits. Currently, in the world, the resistance of rice plants to blast is becoming one of the important indicators of the competitiveness of varieties. The basis for the successful rice breeding for resistance to blast is the availability of source material with a fairly wide spectrum and a high level of resistance. Resistance donors are selected based on the identification of genes that control this trait in rice

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края № 19-416-233009

доноров устойчивости осуществляется на основе идентификации генов, контролирующих этот признак у риса

Ключевые слова: ПОПУЛЯЦИЯ, ПИРИКУЛЯРИОЗ, СОРТА-ТЕСТЕРЫ, ПАТОГЕН, РЕАКЦИЯ СОРТА, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Keywords: POPULATION, BLAST, TESTER VARIETIES, PATHOGEN, VARIETY REACTION, GENETIC VARIABILITY

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-154-005>

## Введение

Фитопатогенный гриб *Pyricularia oryzae* Cav. – гаплоидный аскомицет, утративший сумчатую стадию и осуществляющий функцию размножения и распространения в бесполой фазе – анаморфе. [2,7].

В популяциях с бесполом воспроизведением существует ограниченное число комбинации генов, благодаря чему может наблюдаться тенденция доминирования отдельных клонов. Популяции агамных видов при более или менее равномерном заселении определенной территории фактически лишены потока генов между индивидуумами. Разобщенность единого генного потока и наличие сложной генетической системы вегетативной несовместимости у грибов приводит к тому, что такие популяции фактически могут быть представлены множеством несмешивающихся друг с другом клонов. Клоны могут достигать огромной численности и занимать значительные территории вследствие чрезвычайно высоких темпов размножения и миграционных способностей. Генетическое разнообразие в таких популяциях поддерживается не за счет скрещиваний между особями, а вследствие мутаций и миграции разных клонов [6,8].

В агамных популяциях патогена возбудителя пирикуляриоза риса миграции клонов и спонтанный мутационный процесс обеспечивают значительное генотипическое разнообразие, а дрейф генов приводит к генетической дифференциации в локальных популяциях Краснодарского

края. Агамные популяции *P. oryzae* обладают высоким уровнем генетической изменчивости [7,8].

Болезнь, вызванная *Pyricularia oryzae* Cavara, является одной из самых опасных заболеваний риса. Патоген образует бесцветную многоклеточную грибницу, которая распространяется по межклеточникам и тканям растений.

Конидиеносцы одиночные или собраны в пучки, оливковые или дымчатые, имеют 2-4 поперечные перегородки. Конидии одноядерные, гаплоидные, грушевидные или яйцевидные, двух-, четырех клеточные, светло-оливковые (рисунок 1).



Рис 1 Споры *Pyricularia oryzae* Cav.

Факторы окружающей среды оказывают существенное влияние на соотношение генотипов в популяциях. Поэтому в разных экологических зонах будут формироваться популяции с разными морфолого-культуральными признаками [1,3].

**Цель исследований** – Изучить патотип местной популяции возбудителя пирикулярриоза риса, определить его видовое разнообразие по морфолого - культуральным свойствам.

#### **Объекты и методы исследования**

Объекты исследования – районированные сорта риса, сорта- тестеры и гриб *Pyricularia oryzae* Cav..

Исследования включают следующие этапы [4,5]:

1. Получение инфекционного материала *P. oryzae*: маршрутное обследование производственных и селекционных посевов в рисосеющих зонах края; сбор инфицированного материала (образцов риса, пораженных болезнью).

2. Подготовка патогена для исследований: выделение гриба в чистую культуру (очистка, стабилизация); получение моноспоровых изолятов; наращивание моноспорового материала для инокуляции сортов-дифференциаторов.

3. Идентификация расового состава популяции патогена.

В течение двух (2018-2019 гг.) лет проводили исследования по выявлению эффективных генов устойчивости риса и идентификации популяции патогена *P. oryzae*. Место проведения опыта: РОС КФХ «Чиркова И.В.» (Красноармейский район) и РОС ООО Агрофирма «Приволье» (Славянский район).

В опыте высевали 13 сортов риса, несущих 11 генов устойчивости к патогену: Fukunishiki (Pi-z), IRB1K-KA [CO] (Pi-k)г, IRBL 1 – La (Pi-1), IRB1ta-ME [CO] (Pi-ta), IRB1ta-K1 (Pi-ta), IRBL9-W (Pi-9), IRB19-W (Pi-9), IRB1zt- Ir 56 [CO] (Pi-zt), IRB1b-B [LT] (Pi-b), IRB1z5-Ca [LT] (Pi-z5), IRBLa-Ze [LT] (Pi-a), IR65482-4-136-2-2 (Pi-40), CO39 (No R gene).

Способ посева – ручной, однорядковыми деланками площадью по 0,3 м<sup>2</sup>. Повторность – двукратная. Учет распространенности болезни проводили методом фитопатологического анализа [4].

Культуру гриба выделяли из пораженных листьев, узлов и метелок растений, собранных в течение вегетационного периода развития риса в рисосеющих районах края – Славянском, Крымском, Красноармейском, Абинском и ОПУ ВНИИ риса (Краснодар, пос. Белозерный), таблица 1.

Таблица 1 – Происхождение штаммов *Pyricularia oryzae* Cav, используемых для наращивания спорowego материала в 2018 г.

№ п/п	№ штамма	Район	Дата отбора	Сорт	Часть растения
1	22-18	Славянский	21.07	Рапан	лист
2	25-18	Краснодар, Белозерный	27.07	Диамант	лист
3	27-18	Красноармейский	02.08	Ивушка	лист, узел
4	39-18	Славянский	04.08	Флагман	метелка

Выделяли гриб, как из зеленых, так и с гербарных образцов растений с хорошо выраженными симптомами заболевания. В чашке Петри создавали влажную камеру. Небольшие части исследуемых тканей в количестве 3-10 образцов раскладывали на дно чашки, на предметное стекло.

Для культивирования патогена использовали 2 %-ный морковно-сахарозный агар. Чашки с образцами экспонировали в термостате при температуре  $(27 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Наблюдение за ростом гриба начинали через 48 часов под бинокулярной лупой при 20-50-кратном увеличении. После появления спороношения конидии переносили в каплю дистиллированной воды на предметное стекло, просматривали под микроскопом при увеличении  $\times 120$  и визуально определяли идентичность конидий гриба виду *P. oryzae*. Затем, в стерильной камере, для получения колоний гриба, в чашки Петри со средой переносили кусочки образца диаметром 10-20 мм, наклеивая их на внутреннюю крышку чашки (рис. 1)



Рисунок 1 – Выделение гриба в чистую культуру

После появления роста грибницы очищали культуру от посторонних микроорганизмов многократными пересевами на стерильную питательную среду. При достижении колоний гриба диаметра от 0,5 до 0,75 от размера чашки Петри их рассеивали. Агаровый блок помещали в центр чашки Петри с агаризованной морковной средой, ставя дату посева, и инкубируя в термостате при температуре  $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$  14 суток. Сухой споровый материал получали из чистой 14-дневной культуре гриба *Pyricularia oryzae*, со споруляцией не ниже 20 млн. кон./ч. Петри.

### **Результаты и обсуждение**

В результате проведенных исследований выделены и очищены 4 штамма возбудителя болезни с различной спорулирующей способностью. В таблице 2 приведены морфолого-культуральные признаки полученных штаммов (характер роста колонии, окраска верхнего мицелия и спор, окраска субстрата).

Таблица 2 – Характеристика морфологических типов колоний изолятов возбудителя *P.oryzae*

Штамм	Характер роста	Цвет колонии	Цвет субстрата
22-18	низкий порошистый с четкими концентрическими зонами	темно-серый	от темно-коричневого до черного
25-18	низкий войлочный	однородный серый	темно-серый
27-18	низкий плотный войлочный	однородный светло-серый	серо-коричневый
39-18	низкий порошистый со слабовыраженными концентрическими зонами	неоднородный от серого до коричневого, в центре - белый	интенсивно черный

Как видно из таблицы, штаммы возбудителя значительно отличались друг от друга по морфолого – культуральным признакам. На рисунке 2 проиллюстрированы, культуры штаммов 39 - 18 и 27 – 18, которые отличались по цвету и плотности мицелия.



А



Б

Рисунок 2 – Штаммы 39 - 18 (А) и 27 - 18 (Б)

Всего выделено и очищено 12 штаммов возбудителя болезни с различной спорулирующей способностью. Для дальнейшей работы стабилизировано 4 штамма *Pyricularia oryzae* Cav. с высокой споруляцией и различными морфолого-культуральными признаками.

Изучение внутривидовой структуры популяции возбудителя пирикуляриоза проводили на 13 сортах - дифференциаторах, в Славянском и Красноармейском районах на естественном инфекционном фоне в период интенсивного развития пирикуляриоза, (таблица 3).

В качестве контрольных сортов – индикаторов напряженности инфекционного фона взяты сорта: СО39 (не имеющий гена устойчивости), Победа-65 (неустойчивый к пирикуляриозу) и Авангард (устойчивый). Определена реакция сортов - тестеров риса по пораженности листовой пластинки согласно десятибалльной шкале Международного института риса, которая учитывает тип поражения и интенсивность развития болезни:

Все сорта-тестеры в зависимости от степени поражения условно разделяли на 4 группы: R – устойчивые (балл 0-2), M – с промежуточным типом реакции (балл 3-4), S – восприимчивые (балл 5-6), SS – сильно восприимчивые (балл 7-9).



Таблица 3 – Оценка сортов - тестеров на устойчивость к популяции возбудителя пирикулярриоза риса 2018-2019 гг.

№ п/п	№ сорта по каталогу ВНИИ риса	Сорт-тестер	Ген устойчив.	Красноармейский район		Славянский район	
				2018 год	2019 год	2018 год	2019 год
1	11374	Fukunishiki	Pi-z	R	R	R	R
2	11386	IRBLK-KA [CO]	Pi-k	R	R	R	R
3	11390	IRB11 - La[CO]	Pi-1	R	R	R	R
4	11396	IRB1ta-ME [CO]	Pi-ta	R	R	R	R
5	11401	IRBLzt- Ir 56 [CO]	Pi-zt	M	M	M	M
6	11403	IRBLb-B [LT]	Pi-b	M	M	M	M
7	11404	IRBLz5-Ca [LT]	Pi-z5	M	M	M	M
8	11405	IRBL9-W [LT]	Pi-9	R	R	R	R
9	11407	IRBLa - Ze[LT]	Pi-a	M	M	R	R
10	11434	IRBLta-K1	Pi-ta	R	R	R	R
11	11444	IRBL9-W	Pi-9	R	R		R
12	11453	IR65482-4-136-2-2	Pi-40	R	R	R	R
13	11382	CO39	No R gene	S	S	S	S
14	Победа 65			SS	SS	SS	SS
15	Авангард			R	R	R	R

Результаты оценки устойчивости к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза (*Piricularia oryzae*) показали неоднозначную реакцию сортов-тестеров. В Красноармейском и Славянском районах выявлены эффективные гены устойчивости сортов риса.

### Выводы

Природные изоляты *P.oryzae* проявили значительное разнообразие по морфологии. Было выделено четыре четко дифференцированных морфолого-культуральных типа. В Краснодарском крае возбудитель пирикулярриоза существует в виде локальных изолированных друг от друга

популяций. Заметное различие по морфолого-культуральным признакам краснодарских популяций можно объяснить условиями выращивания сорта-хозяина, степенью его устойчивости в различных зонах рисосеяния края.

Выявлены эффективные гены устойчивости риса к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза в Славянском (Pi-z, Pi-k, Pi-1, Pi-ta, Pi-9, Pi-40) и Красноармейском (Pi-z, Pi-k, Pi-1, Pi-ta, Pi-9, Pi-40) районах.

### Список литературы

1. Брагина, О.А. Устойчивость сортов риса к *Pyricularia oryzae* Cav. в зависимости от условий выращивания / О.А. Брагина, М.А. Ладатко, Е.А. Малюченко // Рисоводство. – 2018. – № 4. – С. 29-32.
2. Драга, А.В. Изменчивость фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. Сравнительное изучение нестабильности моноконидиальных изолятов / А.В., Драга В.А. Терехова, Ю.Т. Дьяков, В.Г. Джавахия // Биол. науки. – 1985. – № 5. – С. 84-89.
3. Зеленский, Г.Л. Иммунологическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика / Г.Л. Зеленский // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. – Большие Вяземы, 2012. – С. – 427-440.
4. Лабораторный экспресс-метод оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. – Большие Вяземы, ВНИИФ, 1990. – С. – 11.
5. Рекомендации по комплексной защите сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорной растительности в Краснодарском крае на 2006-2012 гг. – Краснодар, 2006. – С. 198.
6. Степанов, К.М. Грибные эпифитотии / К.М. Степанов. – М.: Сельхозиздат, 1961. – 471 с.
7. Bonman, J.M. Rice Blast. / J.M. Bonman // In: Compendium of Rice Diseases. Eds. R. K. Webster and P.S. Gunnel. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. – 1992. P. – 14-18.
8. Jia, Y. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance / Y. Jia, S. A. McAdams, G.T. Bryan, H.P. Hershey, B. Valent // EMBO Journal, 2000. – 19. – P. – 4004-4014.

### References

1. Bragina, O.A. Ustojchivost' sortov risa k *Pyricularia oryzae* Cav. v zavisimosti ot uslovij vyrashchivaniya / O.A. Bragina, M.A. Ladatko, E.A. Malyuchenko // Risovodstvo. – 2018. – № 4. – S. 29-32.
2. Draga, A.V. Izmenchivost' fitopatogen'nogo griba *Pyricularia oryzae* Cav. Sravnitel'noe izuchenie nestabil'nosti monokonidial'nyh izolyatov / A.V., Draga V.A. Terekhova, Yu.T. D'yakov, V.G. Dzhavahiya // Biol. nauki. – 1985. – № 5. – S. 84-89.
3. Zelenskij, G.L. Immunologicheskaya zashchita sel'skohozyajstvennyh kul'tur ot boleznej: teoriya i praktika / G.L. Zelenskij // Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-

prakticheskoy konferencii, posvyashchenoj 125-letiyu so dnya rozhdeniya N.I. Vavilova. – Bol'shie Vyazemy, 2012. – S. – 427-440.

4. Laboratornyj ekspress-metod ocenki sortovoj ustojchivosti risa k pirikulyariozu. – Bol'shie Vyazemy, VNIIF, 1990. – S. – 11.

5. Rekomendacii po kompleksnoj zashchite sel'skohozyajstvennyh kul'tur ot vreditelej, boleznej i sornoj rastitel'nosti v Krasnodarskom krae na 2006-2012 gg. – Krasnodar, 2006. – S. 198.

6. Stepanov, K.M. Gribnye epifitotii / K.M. Stepanov. – M.: Sel'hozizdat, 1961. – 471 s.