

ВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПИРИКУЛЯРИОЗА РИСА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ

Брагина О.А., канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,
г. Краснодар, п. Белозерный

Аннотация. В статье представлены экспериментальные исследования по выделению культуры гриба *Pyricularia oryzae* Cav., описаны его морфолого-культуральные свойства, стабилизированы штаммы патогенна с высокой спорулирующей способностью.

Введение. Среди многочисленных болезней сельскохозяйственных культур первое место по распространенности и причиняемому вреду занимают грибные. Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их с того или иного субстрата. На данный момент известно более 500 тысяч видов микроскопических грибов, около 50 видов являются патогенными [1].

Наиболее распространенные болезни на посевах риса в России: альтернариоз (возбудитель – *Alternaria oryzae* Har. Ital); гельминтоспориоз (возбудитель – *Helmintosporium oryzae* Br. de Haan); фузариоз, вызывающую корневую гниль (возбудитель – *Fusarium oxysporum*); пирикуляриоз (возбудитель – *Pyricularia oryzae* Cav.). Из всех грибковых заболеваний наиболее опасным и вредоносным является пирикуляриоз риса [2].

Возбудителем болезни является несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Boome et Savaга принадлежащий к классу Ascomycetes и паразитирующий на молодых активно вегетирующих тканях, образуя бесцветную многоклеточную грибницу, которая распространяется по межклеточникам и тканям растений. В своем развитии он имеет вегетативную стадию, представленную мицелием, и репродуктивную, представленную конидиями, которые формируют конидиеносцы на мицелии. Конидиеносцы одиночные или собраны в пучки, оливковые или дымчатые, имеют 2-4 поперечные перегородки. Конидии грушевидные или яйцевидные, двух-, четырех клеточные, светло-оливковые. Один конидиеносец может образовывать до 20 конидий. Конидии прорастают на поверхности ткани хозяина в присутствии небольшого количества воды. Ростковые трубки появляются через 3-4 часа, на их концах образуются апрессории (округлые или овальные образования размером от 5-15 мкм), благодаря которым происходит закрепление гриба на растении. Апрессорий прорастает в инфекционную гифу и проникает через эпидермис или устьица внутрь тканей растения. Аппрессор меланизированный – специализированная структура, которая создает привязку к инфекции. Меланизация апрессория очень важна, обеспечения достаточного тургорного давления для проникновения инфекционной гифы, богатой актин-

микрофиламентами, которые обеспечивают механическое проникновение в эпидермиальные клетки тканей растения – хозяина [3].

Заражение растений риса может происходить на протяжении всего периода вегетации при наличии на них конидий и свободной влаги. Инкубационный период длится 4-5 дней. Процесс образования конидий на пораженном растении обычно происходит на второй – третий день после завершения инкубационного периода. Пятно на листе продуцирует в сутки в среднем до 6 тыс. конидий в течение двух-трех недель. Каждая вновь образовавшаяся конидия потенциально способна вызвать новое заражение, то есть пораженные растения становятся источниками вторичной инфекции. При наличии благоприятных погодных условий в течение вегетационного периода могут развиваться более 10 генераций патогена [3,4].

Патоген снижает фотосинтетическую активность растений и увеличивает транспирацию. Это приводит к прекращению притока питательных веществ, преждевременному усыханию листьев, уменьшению озерненности метелок и щуплости семян. Интенсивное развитие метельчатой формы пирикулярриоза приводит к потере урожая в пределах 50-70% [1].

Материал и методика исследования. Технология получения спорового материала включает в себя сбор инфицированных растений, выделение и очистку патогена, проверку вирулентности полученных штаммов, анализ интенсивности спороношения, наращивание культуры *Pyricularia oryzae*, сушку и хранение, в течение которого регулярно проводится контроль жизнеспособности спор.

Сбор образцов пораженного риса проведен в течение всего периода развития пирикулярриоза в рисосеющих хозяйствах края. Культура гриба выделена из пораженных листьев, узлов и метелок растений риса. При выделении гриба в чистую культуру применены методы прямого выделения гриба на питательную среду и выделения гриба из пораженной ткани с предварительным помещением во влажную камеру [5,6].

Результаты исследования. Культуру гриба выделяют 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 спорового материала в 2017 г.

№ п/п	№ штамма	Район	Дата отбора	Сорт	Часть растения
1	22-17	Славянский	21.07	Рапан	лист
2	25-17	Краснодар, Белозерный	27.07	Диамант	лист
3	27-17	Красноармейский	02.08	Ивушка	лист, узел
4	39-17	Славянский	04.08	Флагман	метелка

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

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



Рисунок 1. Выделение гриба в чистую культуру, с предварительным помещением во влажную камеру

После появления роста грибницы очищают 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 рассеивают. Агаровый блок помешают в центр чашки Петри с агаризованной морковной средой, ставят дату посева, и инкубируют в термостате при температуре $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 14 суток. Сухой споровый материал получают из чистой 14-дневной культуре гриба *Pyricularia ogyzae*, со споруляцией не ниже 20 млн. кон./ч. Петри (рис. 2).

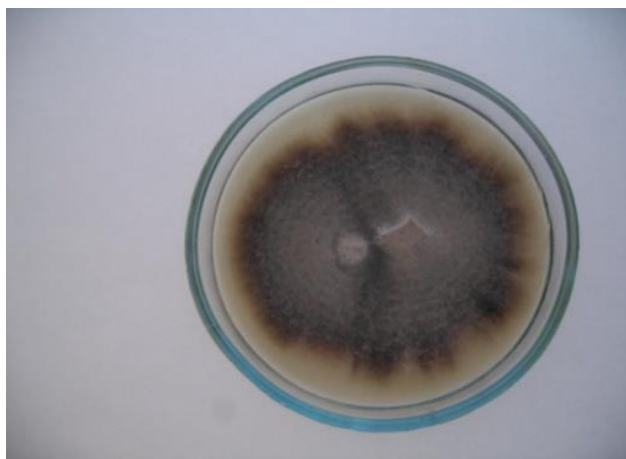


Рисунок 2. Культура гриба *Pyricularia oryzae*

Чашки Петри с чистой 14-дневной культурой достают из термостата, открывают крышку чашки и ставят сушиться при комнатной температуре в течение 10-14 дней.

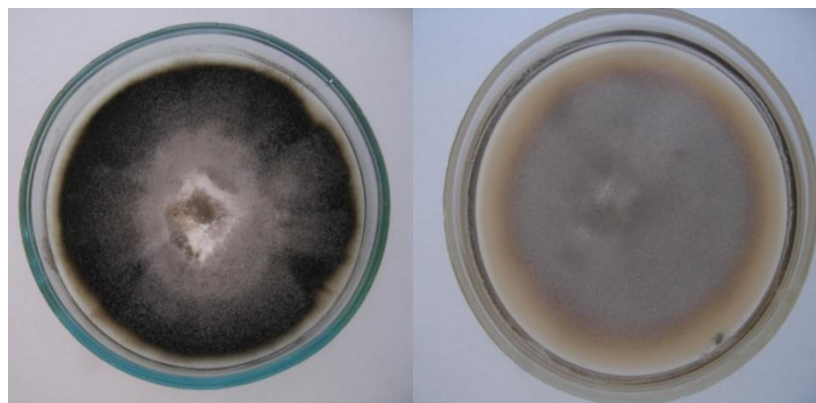
Всего в 2017 году выделено и очищено 4 штамма возбудителя болезни с различной спорулирующей способностью. В таблице 2 приведены морфолого-культуральные признаки полученных штаммов (характер роста колонии, окраска верхнего мицелия и спор, окраска субстрата). После выделения штаммов патогенна в чистую культуру описывают основные культуральные свойства патогенна, данные по которым приведены в таблице 2.

Таблица 2

Морфолого-культуральные признаки штаммов *Pyricularia oryzae* Cav.

Штамм	Характер роста	Цвет колонии	Цвет субстрата
22-17	низкий порошистый с четкими концентрическими зонами	темно-серый	от темно-коричневого до черного
25-17	низкий войлочный	однородный серый	темно-серый
27-17	низкий плотный войлочный	однородный светло-серый	сери-коричневый
39-17	низкий порошистый со слабо выраженными концентрическими зонами	неоднородный от серого до коричневого, в центре - белый	интенсивно черный

Как видно из таблицы 2, штаммы возбудителя значительно отличались друг от друга по морфолого – культуральным признакам. На рисунке 3 проиллюстрированы, в качестве примера, культуры штаммов 39 - 17 и 27 - 17.



А

Б

Рисунок 3. Штаммы 39 - 17 (А) и 27 - 17 (Б)

Вывод. Всего в 2017 году 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.

Литература

1. Степанов, К.М. Грибные эпифитотии / К.М. Степанов. - М.: Сельхозиздат, 1961. – 471 с.
2. 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.
3. Okagaki, A. Genome Sequences of Three Phytopathogenic Species of the Magnaporthaceae Family of Fungi. [G3 \(Bethesda\)](#). 2015 Sep 28;5(12):2539-45. doi: 10.1534/g3.115.020057.
4. Soyong, K. Application of Chaetomium species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control / K. Soyong, S. Kanokmedhakuf, V. Kukongviriyapa, and Isobe, M. (2001).A review article. *Fungal Diversity* 7:1-15.
5. Лабораторный экспресс-метод оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. - Большие Вяземы, ВНИИФ, 1990. - 11 с.
6. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к возбудителю пирикулярриоза. – М.: ВАСХНИЛ, 1988. – 30 с.