

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.27.19

**А. С. Рсалиев, Н. Т. Амирханова, Ж. У. Пахратдинова,
Г. Ш. Ыскакова**

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,

п. Гвардейский, Жамбылская область,
Казахстан

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РОСТА ГРИБА *RYRICULARIA ORYZAE* НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ*

Аннотация В последние годы в рисосеющих регионах Казахстана стала распространяться самая опасная и вредоносная болезнь риса – пирикулярриоз. Патоген поражает все надземные органы растения, что приводит к потере урожая на 30-60 %, а в годы эпифитотий – на 80-100 %. Показаны результаты изучения морфолого-культуральных свойств возбудителя *Ryricularia oryzae*. Отмечено, что состав питательной среды оказывал влияние на морфотип колонии гриба, скорость роста и интенсивность спорообразования. Установлено, что оптимальной средой для культивирования пирикулярриоза риса является картофельно-декстрозный и овсяной агар. По морфолого-культуральным свойствам в казахстанской популяции *R.oryzae* преобладают колонии типа «А» и «Б».

Ключевые слова: рис, пирикулярриоз, морфотип, питательная среда, скорость роста, спороношение.



Түйіндеме. Соңғы уақыттары Қазақстанда пирикулярриоз күріш өсіретін аймақтарда кеңінен таралған, аса қауіпті және зиянды ауру болып табылады. Патоген өсімдіктің вегетативті мүшелерін толық зақымдайды, соның

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках программы грантового финансирования Республики Казахстан на 2013-2015 гг. (грант № 2495/ГФЗ).

салдарынан өнім шығыны 30-60 %, ал эпифитотия болған жылдары – 80-100 % дейін төмендейді. Мақалада *Pyricularia oryzae* қоздырғышының морфологиялық және культуралық қасиеттерін зерттеу нәтижелері көрсетілген. Саңырауқұлақ колонияларының морфологиялық типіне, өсу жылдамдығына және споралану қарқынына қоректік ортаның әсер ететіні анықталған. Күріш пирикулярриозын өсіру үшін картопты-декстрозды және сұлы агарлары ең қолайлы қоректік орта болып саналады. Қазақстанның *P.oryzae* популяциясында морфологиялық және культуралық қасиеттері бойынша «А» және «Б» типті колониялар басымдылық танытады.

Түйінді сөздер: күріш, пирикулярриоз, морфотип, қоректік орта, өсу жылдамдығы, споралану.



Abstract. Last years, in rice sowing regions of Kazakhstan it is started to spread the most dangerous and harmful disease of rice – *pyriculariaoryzae*. The pathogen attacks all the overground plant organs, which leads to the loss of yield by 30-60 %, and in the years of epiphytotics – 80-100 %. This article shows the result of study of morphological and cultural properties of the pathogen *pyriculariaoryzae*. It is noted that the composition of the nutrient medium influenced the colony morphotype of fungus, growth rate and intensity of sporulation. It is found that the optimal medium for the cultivation of *pyriculariaoryzae* are potato dextrose and oatmeal agar. According to the morphological and cultural properties in the Kazakhstan population it is dominated the colony of «A» and «B» type.

Key words: rice, *pyriculariaoryzae*, morphotype, nutrient medium, growth rate, sporulation.

Введение. Пирикулярриоз – одно из наиболее вредоносных заболеваний риса. Возбудитель болезни – несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Br. et Cav. из порядка *Hyphomycetales* – образует бесцветную многоклеточную грибницу, располагающуюся по межклетникам тканей растений. Во время вегетации растений гриб распространяется конидиями, сохраняется в форме грибницы на стерне и соломе риса, а также на семенах. Вредоносность пирикулярриоза заключается в снижении всхожести семян, гибели всходов, выпадении отдельных растений во время вегетации, меньшем образовании зерна в колосках, а также в формировании недоразвитых или щуплых семян. Патоген поражает все надземные органы растения, что приводит к потере урожая на 30-60 %, а в годы эпифитотий – на 80-100 % [1, 2].

В Казахстане основной ареал распространения и вредоносности болезни находится в Кызылординской области. При этом пирикулярриоз риса впервые в условиях Кызылординской области был зафиксирован в 1950-е гг. [3]. Затем до середины 1990-х гг. это заболевание здесь не отмечалось. Эпифитотии болезни в Сырдарьинском, Жалагашском, Жанакорганском районах наблюдались в 1998 г. и были обусловлены благоприятными погодными условиями. По мнению фитопатолога М. Койшыбаева [4], возбудитель пирикулярриоза здесь присутствовал постоянно, но из-за отсутствия благоприятных погодных условий заболевание проявлялось в слабой степени и не замечалось. В 2005 г. рис был поражен в отдельных хозяйствах, где были нарушены технологии применения минеральных удобрений, в 2006 г. вновь зафиксирована вспышка этой болезни [5]. В 2012 г. очаги пирикулярриоза обнаружены на рисовых чеках в Кармакшинском, Сырдарьинском, Шиелийском районах, где потери зерна доходили до 25 % [6].

В 2013-2014 гг. авторами был проведен фитосанитарный мониторинг на производственных посевах в Казалинском, Кармакшинском, Жанакорганском, Сырдарьинском и Шиелийском районах Кызылординской области. В конце июля – начале августа повсеместно были отмечены очаги пирикулярриоза, заболевание выражено в листовой и метельчатой формах. На обследованных полях риса распространение пирикулярриоза колебалось в пределах 4,8-16,4 %, а развитие болезни – 6,9-13,8 % соответственно.

По данным рисоводов и ученых Казахского НИИ рисоводства им. Ы. Жакаева, в последнее время крупные хозяйства стали заблаговременно обрабатывать посевы риса фунгицидами, хотя это требует немалых финансовых средств, особенно при возделывании неустойчивых сортов к пирикулярриозу. Стоимость обработки 1 га посева обходится сельхозтоваропроизводителю в 4000-4500 тенге. По подсчетам, ежегодный урон, т. е. потери продукции рисоводства от пирикулярриоза составляют 3-4 ц/га, в целом по Кызылординской области это около 20 тыс. т, или же в денежном выражении более 1 млрд. тенге.

Именно поэтому требуется проведение экстренных мероприятий по исследованию данного патогена на территории Республики Казахстан. В целях создания инфекционных фондов, необходимых для интенсивной селекции растений на устойчивость к болезни, требуется большое количество инокулюма. Нарботка инокулюма в лабораторных условиях невозможна без знания морфолого-культуральных особенностей возбудителя, а также подбора оптимального субстрата для роста и спороношения гриба. В настоящее время для получения чистых культур пирикулярриоза риса, поддержания их жизнеспособности в целях дальнейшего изучения применяют различные агаризованные питательные среды. Однако их влияние на основные морфолого-культуральные свойства возбудителя *P. oryzae* до настоящего времени полностью не изучено. Кроме того, не определена эффективность различных агаризованных питательных сред для культивирования гриба. Как следствие, в республике коллекция изолятов возбудителя пирикулярриоза не собрана и отсутствует генофонд семян болезнеустойчивых сортов риса.

Материалы и методы исследования. В работе использованы отрезки листьев риса (сорт маржан, дата сбора 17.07.2014 г.), пораженных пирикулярриозом в условиях Кызылординской области. Первоначально выделение изолятов гриба проводили на картофельно-сахарозном агаре. Готовые питательные среды разливали по 20-30 мл в чашки Петри в стерильных условиях. Пораженный образец тщательно промывали сначала в проточной воде и стерилизовали этиловым спиртом в течение 3 мин., а затем многократно в стерильной воде и подсушивали стерильной фильтровальной бумагой [7].

С помощью микроскопа на пораженной ткани находили участок с конидиями и производили посев на питательную среду в чашку Петри. Пораженные листья (5×5 мм) переносили непосредственно на питательную среду, затем засеянные чашки Петри выдерживали 2 сут. в термостате при температуре 25 °С. После этого культуры переносили в ламинарный бокс с интенсивностью освещения не менее 10 лк, при этом температура на их поверхности составляла 18-24 °С [7].

Через 7-10 дней на поверхности агара появлялись небольшие белые или серые колонии гриба, которые со временем начинали темнеть. Полученные таким образом изоляты гриба пересевали на поверхность агаризованных питательных сред различного состава. Повторность опыта 3-кратная.

Оценку морфолого-культуральных признаков колоний грибов проводили по цвету и топографии воздушного и субстратного мицелия, спорулирующей активности на 15-й день роста колоний пирикулярриоза, а также по пигментации питательной среды и интенсивности строения гриба. Основные морфологические типы колоний *P. oryzae* представлены в табл. 1.

Таблица 1

Культурально-морфологическая характеристика колоний возбудителя *P. oryzae*

Тип колонии	Мицелий	
	воздушный	субстратный
А	Грязно-серый, приземистая колония, порожкообразная. На этом фоне отмечается в большем или меньшем количестве пучки более светлого мицелия культурального типа. Колонии от серого до темно-коричневого цвета	Желтовато-серая окраска всей площади колонии. Грязно-белый с желтовато-коричневым оттенком
Б	Серовато-оливковый цвет, с яркой оливковой каймой. Мицелий грубый, рыхлый	Грязно-беловатый с желтым оттенком
С	Грязно-сероватый плотный комковатый	Интенсивно черно-коричневый с розоватым оттенком
Р	От светло-серого до розового цвета, более или менее рыхлый, средней плотности	С коричневато-черной каймой
Ш	Светло-серого цвета, средней плотности, серовато до желтого коричнево-черного цвета	Розовато-желтоватый, с коричнево-черной каймой
Е	Серый плотный розовато-беловатый, плотный	С коричневато-темноватой каймой

Количество спор в суспензии (на 1 см² площади колонии) определяли с помощью камеры Горяева по формуле:

$$N = \frac{M \times 2500 \times V \times 100}{S},$$

где N – количество спор на 1 мм² площади колонии;

M – число спор в 10 больших квадратах камеры Горяева;

V – объем воды, мл;

S – площадь колонии, мм²;

2500 – экспериментально вычисленный коэффициент для пересчета на 1 мл.

Отдельные морфологические признаки определены с помощью цифрового микроскопа (MC 300TS, Австрия). Анализ микроскопических изображений проведен по компьютерной программе Motic Images 2000-1.3. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Различия считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Изначально на основе анализа литературных данных были подобраны разные питательные среды для культивирования возбудителя *P. oryzae*: картофельно-сахарозный агар (КСА), картофельно-глюкозный агар (КГА) [8], картофельно-декстрозный агар (КДА), овсяной агар (ОА) [9-11], рисовый агар (РА), мальтозно-экстрактный агар (МЭА) [12]. Состав питательных сред показан в табл. 2.

Таблица 2

Состав питательных сред для культивирования возбудителя *P. oryzae*

Питательная среда	Состав среды	Режим стерилизации
1	2	3

КГА Картофельно-глюкозный агар – 40 г, нистатин – 200 мг, дистиллированная вода – 1000 мл

1 атм в течение 15 мин.

Окончание табл. 2

1	2	3
КСА	Картофель (отвар) – 200 г, сахароза – 20 г, агар – 20 г, нистатин – 200 мг, дистилли­рованная вода – 1000 мл	1 атм в течение 30 мин.
ҚДА	Картофельно-декстрозный агар – 40 г, нистатин – 200 мг, дистиллированная во­да – 1000 мл	1 атм в течение 15 мин.
ОА	Овсяные хлопья – 125 г, агар – 24 г, нистатин – 200 мг, дистиллированная вода – 1000 мл	1 атм в течение 30 мин.
РА	Рис – 15 г, агар – 20 г, нистатин – 200 мг, дистиллированная вода – 1000 мл	1 атм в течение 15 мин.
МЭА	Мальтоза – 12,75 г, декстрин – 2,75 г, пеп­тон – 0,78 г, глицерол – 2,35 г, агар – 15 г, нистатин – 200 мг, дистиллированная вода – 1000 мл	1 атм в течение 15 мин.

Результаты эксперимента показали, что гриб *P. oryzae* легко культивируется в условиях *in vitro*, но его морфолого-культуральные особенности зависят от состава питательной среды. При этом *P. oryzae* является диморфным организмом и в типичном случае, при посеве на питательную среду они начинают формировать дрожжеподобные колонии, состоящие из почкующихся клеток. Далее колонии становятся мицелиальными, там же формируются, и развиваются конидии гриба. При этом конидиеносцы прямые, неразветвленные, тонкие, оливковые или дымчатые, в основании более темные, с 2-4 поперечными перегородками, 80-180×4-6 мкм, конидии на вершине конидиеносца расположены одиночно или по нескольку на коротких ножках. Конидии (споры) грушевидные или яйцевидные, светло-оливковые, с 2-3 поперечными перегородками, обычно 19-25×8-10 мкм, иногда 40×18 мкм (рис. 1).

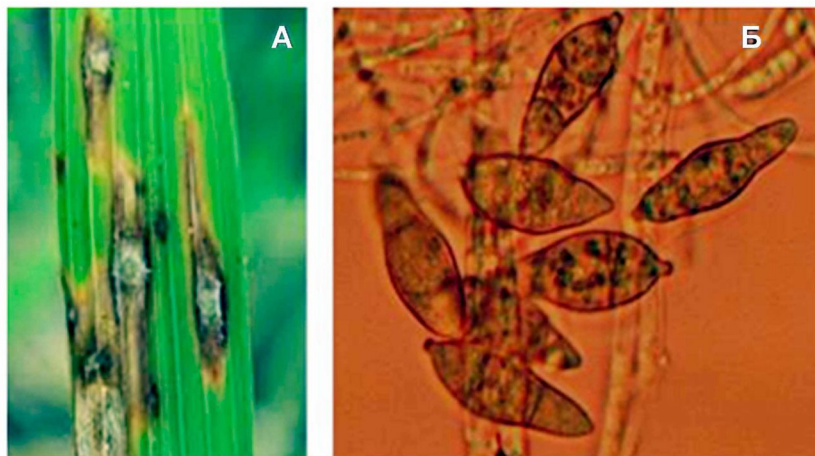


Рис. 1. Листовая форма пирикуляриоза риса (А) и конидий *P. oryzae* (Б), ув. 100 \times 1,25

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что в составе казахстанской популяции *P. oryzae* в основном встречаются колонии типа «А» и «Б». Колонии типа «А» были отмечены при использовании КДА, КГА, ОА, а колонии типа «Б» – КСА, РА и МЭА соответственно. Состав питательной среды оказывал влияние на морфотип колонии гриба. При этом на КГА образовались колонии от серовато-черного до серого цвета с шерстистым и неровным мицелием, с желтоватым оттенком.

На КСА колонии обладали серовато оливковым цветом, с оливковой каймой, мицелий гриба более рыхлый, а субстрат – приобретали грязно-беловатый и желтоватый оттенок. На РА мицелий гриба развивался в слабой степени, с серовато-оливковым оттенком. На МЭА мицелий возбудителя слаборазвитый, с серовато-оливковым цветом и грязно-беловатый с желтоватым оттенком. Вариабельность культуры *P. oryzae* по отмеченным признакам наглядно демонстрирует генетическую изменчивость в природных популяциях возбудителя пирикуляриоза.

О пригодности той или иной среды для роста гриба судят по скорости его роста на агаризованных средах. В связи с этим при

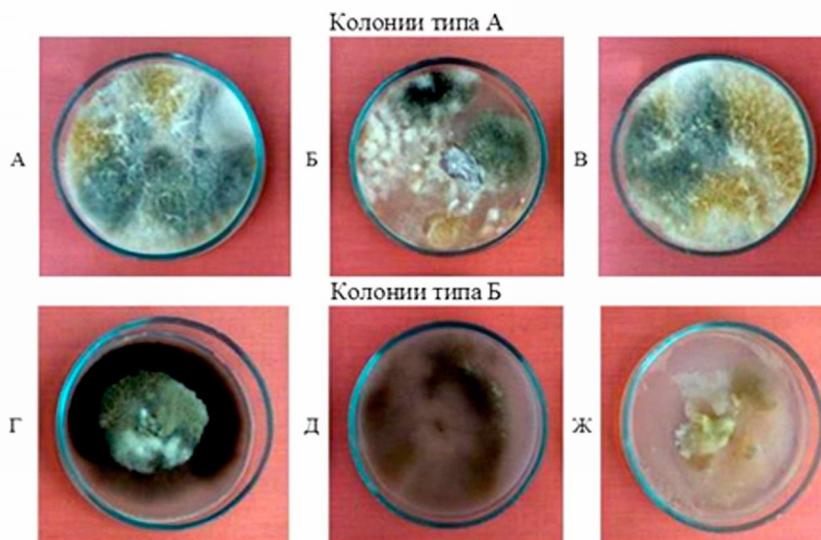


Рис. 2. Рост культуры *P. oryzae* в агаризованных питательных средах: А – КДА; Б – КГА; В – ОА; Г – КСА; Д – РА; Ж – МЭА

проведении исследований одной из задач было определение скорости роста колоний и спороношения гриба на разных агаризованных средах. Колонии возбудителя *P. oryzae* на ОА и КДА обладали высокой скоростью роста, и диаметр колоний через 15 сут. достигал до 86,0-86,7 мм, но при этом не имели между собой достоверной ($P>0,05$) разницы. На КГА, КСА и РА диаметр колоний была в пределах 78,3-80,0 мм, а на МЭА – 50,1 мм и значительно отличался от остальных. Следует отметить, что на всех средах развитие и рост колоний гриба прекратились после 15 сут. культивирования, дальше произошло уменьшение конидиального спороношения гриба. Статистическая оценка значимости различий между отмеченными выборками показала, что состав питательной среды влияет на скорость роста колоний гриба ($P<0,05$). В результате проведенных исследований установлено, что среди агаризованных питательных сред наиболее благоприятными для

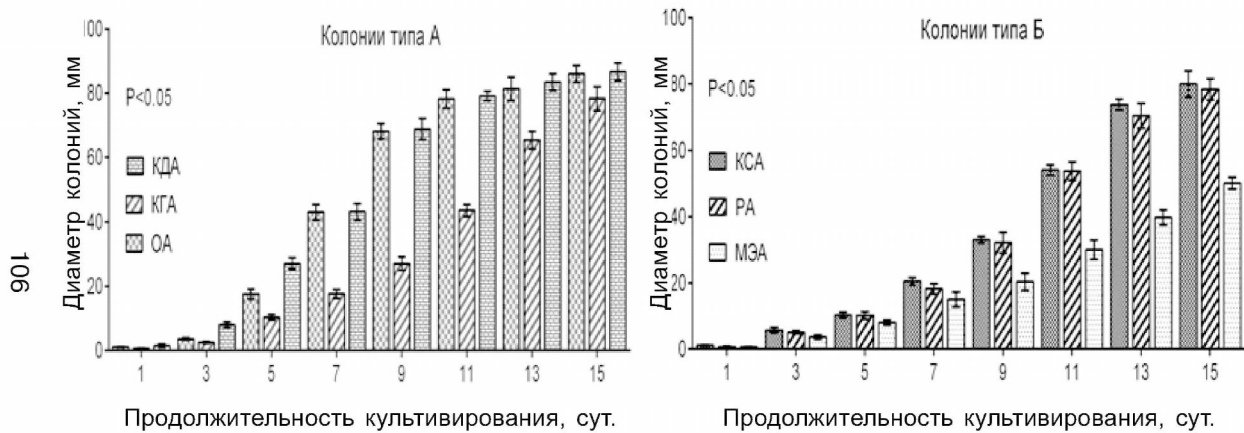


Рис. 3. Влияние состава питательной среды на рост гриба *P. oryzae*

роста колоний и спорующий изолятов пирикулярриоза риса яв­ляются картофельно-декстрозный и овсяной агар (рис. 3).

В задачи исследований также входило определение титра суспензии конидий патогена при культивировании на различных питательных средах. Титр спор определяли на 9-, 12- и 15-е сут­ки после посева. В результате, споруляция *P. oryzae* также раз­личалась в зависимости от питательной среды. Максимальная интенсивность образования спор была отмечена на ҚДА и ОА – $3,0-3,5 \times 10^7$ спор/мл за 15 сут. На средах КГА и КСА титр кониди­альной суспензии гриба был в пределах $1,6-2,7 \times 10^5$ спор/мл. При использовании РА и МЭА исследуемые параметры были низкие, точнее, данный показатель незначительно меньше, чем сред­ний уровень – $2,5 \times 10^4$ и $1,0 \times 10^3$ спор/мл соот­ветственно. Это объяс­няется тем, что состав питательной среды влия­ет не только на ско­рость роста, а также на спороношение колоний гриба *P. oryzae*. Резуль­таты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Титр конидиальной суспензии гриба
P. oryzae на различных питательных
средах**

Пита­ тельная среда	Титр спор/мл		
	на 9-е сут.	на 12-е сут.	на 15-е сут.
ҚДА	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
ОА	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$
КГА	$1,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
КСА	$1,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$
РА	$1,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
МЭА	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$

**Обсуждение ре­
зультатов.** В начале
эксперимента на основе
анализа мировой лите­

ратуры были подобраны разные агаризованные питательные среды (ҚДА, КГА, ОА, КСА, РА, МЭА) для культивирования возбу­дителя *P. oryzae* [8-12]. Результаты опыта показали, что не все использованные среды являются оптимальными для выделения и изучения изолятов гриба. При этом статистическая обработка данных также подтверждает влияние состава питательной сре­ды на морфолого-культуральные особенности пирикулярриоза риса ($P < 0,05$). На основе полученных результатов установлено, что среди агаризованных питательных сред наиболее благопри-

ятными для роста колоний и споруляций изолятов пирикулярриоза риса являются картофельно-декстрозный и овсяной агар.

Некоторые ученые для выделения изолятов пирикулярриоза риса в чистую культуру использовали агаризованные питательные среды (КДА, ОА, РА) с внесением различных эфирных масел и других добавок. В ходе эксперимента наблюдалось торможение роста мицелия в перцовом масле. Эфирное масло, живица и масло кориандра оказались менее эффективными для культивирования гриба [13]. Учитывая неэффективность вышеотмеченного подхода, нами не были использованы различные добавки в процессе подготовки агаризованных питательных сред. По мнению отдельных зарубежных ученых, для выделения изолятов пирикулярриоза риса в чистую культуру самой эффективной средой является КДА со стандартным составом [12], что согласуется с полученными нами результатами. В разных странах с использованием КДА и ОА были получены изоляты *P. oryzae*, которые между собой отличаются по морфологическим признакам и по уровню скорости роста [8-12].

По результатам проведенных исследований установлено, что в дальнейшем необходимо усилить научные работы по выделению изолятов с использованием питательной среды КДА и ОА, а также по изучению расового состава пирикулярриоза риса в Казахстане, так как возбудители болезни риса являются живыми организмами и под влиянием природных и антропогенных факторов происходят постоянные изменения их структуры. Исследование расового состава гриба имеет следующие практические аспекты: оценка эффективности генов устойчивости, изучение механизмов изменчивости популяций патогена и выявление ареалов и путей миграции спор с целью координации селекции на устойчивость в различных географических регионах. Новые расы патогена не только наносят громадный экономический ущерб, но и резко сокращают срок использования районированных сортов. Не зря во время «холодной войны» вирулентные расы и изоляты пирикулярриоза риса готовили в качестве биологического оружия, использование которого может привести к серьезному голоданию бедных стран, а также к другим потерям и проблемам.

Выводы. В процессе культивирования гриба *P. oryzae* на агаризованных питательных средах были подобраны недорогие, доступные и несложные в приготовлении среды, благоприятные для роста колоний и спорующих изолятов пирикулярноза риса. По морфолого-культуральным свойствам в казахстанской популяции возбудителя *P. oryzae* преобладают колонии типа «А» и «Б». Результаты исследований можно использовать при проведении фитопатологических и иммунологических исследований.

Литература

- 1 Teng P.S., Klein-Gebbinck H., Pinnschmidt H. An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting // Blast Modeling and Forecasting // IRRI, Manila, Philippines. 1991. – P. 1-30.
- 2 Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // Korean J.Breed. – 2003. – Vol. 35. – P. 133-140.
- 3 Казенас Л.Д. Болезни сельскохозяйственных растений Казахстана. – Алма-Ата: Кайнар, 1974. – 366 с.
- 4 Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – Алматы: Бастау, 2002. – 368 с.
- 5 Абилдаева Ж.А. Основные болезни риса в Приаралье и меры борьбы с ними / Кызылорд. Гос. ун-т им. Коркыт-Ата, 2006. http://www.rusnauka.com/ESPR_2006/Agricole/5_abildaeva.doc.htm
- 6 Жакибаева М. Когда цветет рис // Кызылординские вести. http://kv.ucoz.kz/news/kogda_cvetet_ris/2012-07-26-11093.26.07.2012.
- 7 Методы экспериментального изучения микроскопических грибов // Сост. В.Д.Поликсенова, А.К.Храмцов, С.Г.Пискун. – Минск, 2004. – 36 с.
- 8 Deepti S., Shamim Md., Deepak K., Pramila P., Khan N.A., Singh K.N. Morphological and molecular characterization of *Pyricularia oryzae* causing blast disease in rice (*Oryza sativa*) from North India // International Journal of Scientific and Research Publications. – 2014. – Vol. 4. – P. 1-9.

9 *Suada K., Suhartini D.M., Sunariasih N.P.L., Wirawan G.P. Chun K.W., Cha J.Y., Ohga S.* Ability of Endophytic Fungi Isolated from Rice to Inhibit *Pyricularia oryzae*-Induced Rice Blast in Indonesia // *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* – 2011. – Vol. 57. – P. 51-53.

10 *Shyamala L., Sivakumaar R.K.* Research article *Pseudomonas fluorescens* mediate disease resistance in rice against rice blast caused by *Pyricularia oryzae* // *International Journal of Recent Scientific Research.* – 2012. – Vol. 3. – P. 853-857.

11 *Ebrahimi Zarandi M., Shahidi Bonjar G.H., Padasht Dehkaei F.* In vitro antagonistic antifungal-activity of *Streptomyces* isolate 339 against *Magnaporthe oryzae* // *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.* – 2013. – Vol. 8. – P. 212-216.

12 *Vanaraj P., Kandasamy S., Ambalavanan S., Ramalingam R., Sabariyappan R.* Variability in *Pyricularia oryzae* from different rice growing regions of Tamil Nadu, India // *African Journal of Microbiology Research.* – 2013. – Vol. 7. – P. 3379-3388.

13 *Mithrasena Y.J.P.K., Wijesundera R.L.C., Wimalasiri D.C., Priyanthi R.P.N.* Pathogenic and Genetic Diversity of *Magnaporthe oryzae* Populations from Sri Lanka // *Rice Science.* – 2012. – Vol. 19. – No. 3. – P. 241-246.

Рсалиев Аралбек Сырашович, кандидат сельскохозяйственных наук
тел. +7 701 606 18 25; e-mail: aralbek@mail.ru

Амирханова Нургул Темиржановна, кандидат биологических наук
тел. +7 775 704 30 50; e-mail: n.amirkhanova@mail.ru

Пахратдинова Жазира Усеновна, магистр естественных наук
тел. +7 775 378 18 55; e-mail: Zhazyra_555@mail.ru

Ыскакова Гулбахар Шахзидаызы, магистр естественных наук
тел. +7 702 863 07 21