

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПИРИКУЛЯРИОЗА РИСА *Pyricularia oryzae* Cav. ПО КОМПЛЕКСУ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

© 2023 г. Д. В. Нартымов¹, Е. В. Дубина^{1, 2, *}, М. Г. Рубан¹, Ю. В. Анискина³, С. В. Гаркуша^{1, 2},
И. А. Шилов³, Н. С. Велишаева³, О. С. Колобова³, Н. К. Истомин¹

¹Федеральный научный центр риса, Краснодар, пос. Белозерный, 350921 Россия

²Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Краснодар, 350044 Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

*e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 16.12.2022 г.

На основе молекулярно-генетических подходов проведено изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России и проведена классификация морфолого-культуральных и генетических признаков патогена. За 2020–2022 гг. проведен мониторинг и выделено 24 штамма патогена из пораженного гербарного материала, собранного с полей пяти экологических рисосеющих зон Краснодарского края (Красноармейского, Калининского, Абинского, Славянского районов, Краснодар). С использованием мультиплексной системы ПЦР на основе фрагментного анализа среди изученных штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. за весь период выполнения проекта выявлено пять генотипов, каждый из которых характеризуется уникальным генетическим профилем. Составлены их “ДНК-паспорта”. Изученные изоляты возбудителя пирикулярриоза охарактеризованы по морфолого-культуральным признакам. Выделено шесть морфотипов патогена.

Ключевые слова: генетическое биоразнообразие, фитопатогенные грибы, пирикулярриоз (*Pyricularia oryzae* Cav.), патотип, штаммы, SSR-локусы, ПЦР, ДНК-паспорта.

DOI: 10.31857/S0016675823060127, **EDN:** SUNFYL

Пирикулярриоз риса остается одной из самых проблематичных особенностей в технологии выращивания риса на территории Краснодарского края. Широкое применение фунгицидов, направленная селекция и предварительная подготовка почвы во многом помогают сельхозтоваропроизводителям снизить вероятность возникновения патогенеза. Однако изменчивость патогена позволяет ему достаточно быстро приспособиться к таким условиям и развиваться на растениях риса.

Для проведения направленных работ по селекции риса необходимо учитывать тенденции развития признаков патогена *Pyricularia oryzae* Cav., его генотипа и морфологических признаков, позволяющих ему, в том числе, поражать различные части растения. С целью мониторинга динамики развития штаммов на территории юга России на базе лаборатории информационных цифровых и биотехнологий ФГБНУ ФНЦ риса была создана база данных “Биоразнообразие штаммов фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. для рисосеющих хозяйств юга России” [1]. База данных позволяет систематизировать данные по генетиче-

ским и морфолого-культуральным признакам штаммов пирикулярриоза риса, полученные в результате проведения научно-исследовательских работ.

Систематизация данных по признакам штаммов пирикулярриоза риса позволит выявить закономерности распределения популяций патогена на территории рисосеяния и установить взаимосвязь между популяциями, выявленными в результате проведения исследований. Определение родственного сходства генотипов и морфолого-культуральных признаков позволит достоверно установить обусловленность локализации популяций на территории рисосеяния Краснодарского края. Выявление таких связей создаст условия для имплементации данных в модели селекционных работ в рисоводстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. выделяли из пораженных тканей риса (узлов стебля, листьев, частей метелки), собранных с рисовых

полей, в соответствии с методическими указаниями, разработанными во ВНИИ фитопатологии [2]. Образцы пораженной ткани промывали стерильной водой и размещали на стерильную морковно-сахарную агаровую среду в чашки Петри, которые затем устанавливали во влажную (100%) камеру при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$, оптимальной для образования конидий гриба *P. oryzae*. Нарастивание мицелия для выделения ДНК проводили в чашках Петри на жидкой морковной агаризованной среде. Полученную культуру культивировали до необходимой степени чистоты.

При регистрации отбираемых штаммов патогена фиксировали зону [3] и район отбора гербарного материала, а также сорт и часть растения, пораженного пирикулярриозом.

После получения культуры проводили описание фенотипических свойств в соответствии с классификацией морфолого-культуральных признаков штаммов *P. oryzae* [4].

Генотипирование штаммов возбудителя пирикулярриоза проводили в лабораториях информационных, цифровых и биотехнологий ФГБНУ ФНЦ риса и анализа генома ФГБНУ ВНИИСБ молекулярно-генетическими методами. Грибную ДНК выделяли из смеси мицелия и конидий моноконидиальной культуры гриба *P. oryzae* методом СТАВ (Murray and Thompson, 1980). Метод заключается в использовании гексадецилтриметиламмония бромида в качестве детергента в лизирующем буфере. Состав лизирующего СТАВ-буфера: 0.2 M Tris-HCl, pH 8; 2 M NaCl; 0.05 M EDTA; 2% СТАВ.

При достижении необходимой биомассы при культивировании мицелий снимали с чашек, растирали его в 700 мкл лизирующего СТАВ-буфера в стерильной керамической ступке. Затем полученную смесь переносили в пробирку Eppendorf и инкубировали при 65°C в течение часа. К полученной смеси добавляли 500 мкл хлороформа и центрифугировали 10 мин при 13000 об./мин. После с помощью пипетмана на 1000 мкл отбирали 500 мкл надосадочной жидкости, добавляли к ней еще 500 мкл хлороформа и повторяли центрифугирование. К полученному супернатанту добавляли 400 мкл изопропанола и ставили в морозильную камеру на 2 ч. После центрифугировали 10 мин при 13000 об./мин. Выпавший осадок ДНК промывали охлажденным 70%-ным этанолом и ресуспендировали в 50 мкл буфера TE для хранения при температуре -20°C .

Амплификацию ДНК фитопатогенного гриба *P. oryzae* проводили в объеме 25 мкл, содержащем однократный ПЦР-буфер, 1.25 ед. *Taq* ДНК-полимеразы, 100 мкмоль dNTP (ООО НПО “ДНК-Технология”, Россия), по 10 пкмоль каждого праймера и по 5 мкл раствора ДНК в детектирующем термоциклере (CFX-BioRad, США) по

программе: $95^\circ\text{C} - 10$ мин; 30 циклов: $94^\circ\text{C} - 30$ с, $55^\circ\text{C} - 30$ с, $72^\circ\text{C} - 30$ с.

Визуализация продуктов ПЦР выполняется на автоматическом генетическом анализаторе НАНОФОР-05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) при поддержке центра коллективного пользования “Биотехнология” ФГБНУ ВНИИСБ.

Обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения ДНК ФА (ИАП, Россия).

Набор данных, полученных при генотипировании и изучении морфолого-культуральных признаков, был перенесен в базу данных “Биоразнообразие штаммов фитопатогенного гриба *P. oryzae* для рисосеющих хозяйств юга России” [3], согласно установленной структуре. Таким образом, устанавливалась явная связь между особенностями образца и его изучаемыми свойствами, а систематизированные данные позволяли проводить глубокий статистический анализ.

Анализ данных представлял собой выявление совокупности однородных признаков штаммов по генотипу и фенотипу культуры путем сопоставления присутствия отдельного признака. Близость штаммов описывается иерархической кластеризацией по методу Ward [5], а полученная дендрограмма выявляет родственные связи. Иерархическую кластеризацию по методу Ward проводили при помощи алгоритмов модуля SciPy 1.8.0 Python 3.10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период проведения исследовательской работы было получено 9 штаммов в 2020 г. и 15 штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. в 2021 г. (табл. 1).

При наращивании культуры были получены 24 образца, которые проявляли повторяемые признаки развития колонии. Полученные колонии были отобраны для описания морфолого-культуральных признаков патогена и генотипирования его штаммов (рис. 1, 2).

Результаты генотипирования и изучения морфолого-культуральных признаков приведены в табл. 2.

Важно отметить наличие большого количества образцов с зонированным характером роста, а в культурах штаммов 2021 г. преобладание этого характера роста выше, чем в культурах штаммов 2020 г.

Также в каждой временной группе образцов присутствуют штаммы с уникальными морфолого-культуральными признаками. Так, в 2020 г. выявлен штамм 1.20 с колонией разнонаправленного характера роста клочковатой структуры и коническим рельефом низкого профиля, а в 2021 г. — штамм 11.21 с колонией равнонаправленного ха-

Таблица 1. Штаммы *Pyricularia oryzae* Cav.

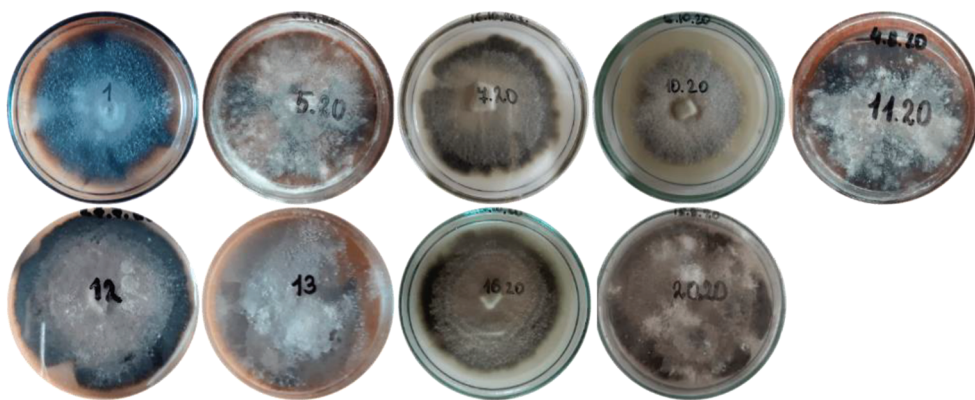
Номер штамма	Зона	Район	Сорт	Часть
2020 г.				
1.20	В	Красноармейский район	Чайка	Лист
5.20	В	»	Фаворит	»
7.20	В	»	Полевик	»
10.20	В	»	Рапан	»
11.20	В	Калининский район	Исток	»
12.20	В	Красноармейский район	»	»
13.20	В	»	»	»
16.20	А	Славянский район	Рапан	Ножка метелки
20.20	В	г. Краснодар	КП-20	Узел
2021 г.				
1.21	С	Абинский район	Рапан	Лист
3.21	В	Красноармейский район	Фаворит	»
5.21	А	Славянский район	Регул	»
6.21	А	»	Рапан	»
7.21	А	»	Полевик	»
8.21	С	Абинский район	Рапан	»
9.21	В	Красноармейский район	Рапан 2	»
11.21	В	»	Исток	»
12.21	В	»	Полевик	»
13.21	В	»	Патриот	»
14.21	В	»	Рапан	»
15.21	В	»	Патриот	»
17.21	С	Северский район	Фаворит	»
18.21	С	Тахтамукайский район	КП 34-16	»
19.21	А	Славянский район	Сонет	Узел

рактика роста однородной структуры и равномерным рельефом низкого профиля.

Данные внесены в базу данных “Биоразнообразие штаммов фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. для рисосеющих хозяйств юга России” и инициирована процедура обновления базы данных. Внесена информация о 24 штаммах пирикулярноза риса, выявленных в 2020 и 2021 гг., и связанных с ними генотипах и фенотипах.

Иерархический кластерный анализ данных образцов изучаемых штаммов был проведен отдельно для штаммов, выделенных в разные годы, для выявления миграции и временной переходности генетического материала между зонами рисосеяния юга России.

Результаты кластеризации представлены на рис. 3 и 4.

Рис. 1. Культуры штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., полученных в 2020 г.

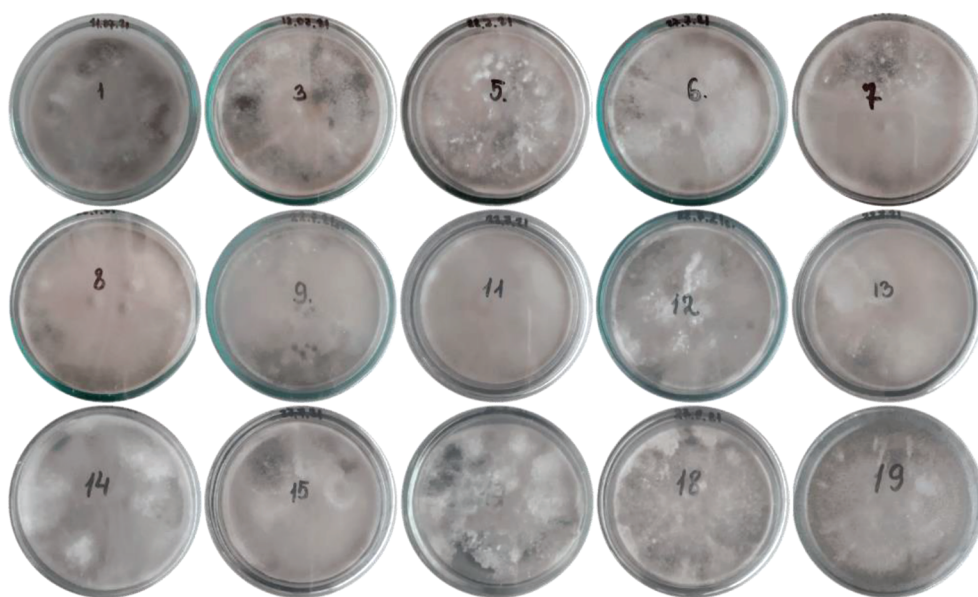


Рис. 2. Культуры штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., полученных в 2021 г.

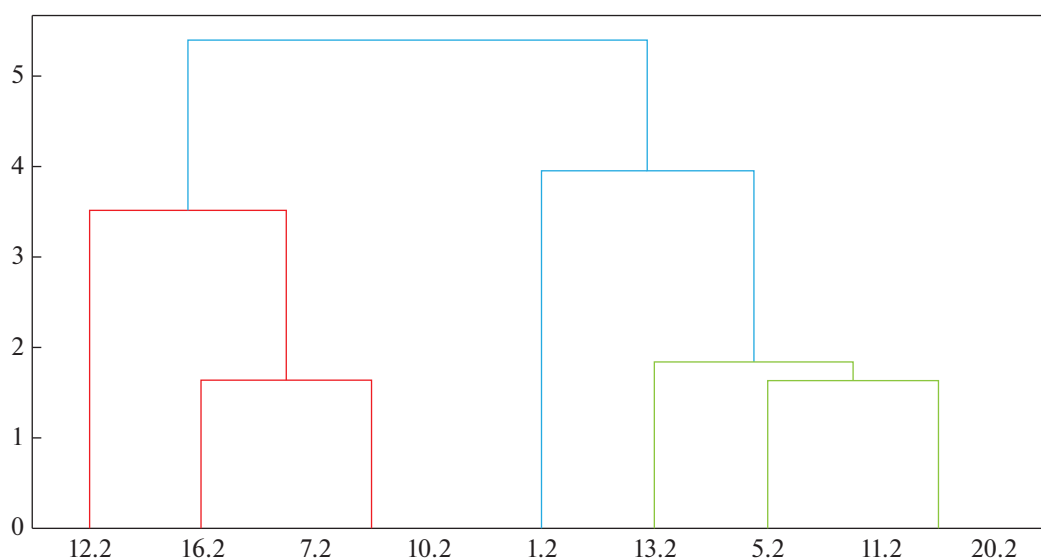


Рис. 3. Дендрограмма кластеризации штаммов, выделенных в 2020 г.

Из дендрограммы рис. 3 видно, что на дальнем расстоянии набор штаммов образует четыре кластера, которые объединены преимущественно по близости генетических признаков и высокой однородности морфолого-культуральных признаков. Так, штаммы второго кластера (16.20, 7.20, 10.20) имеют одинаковый генотип, а штаммы четвертого (13.20, 5.20, 11.20, 20.20) – сходный фенотип (табл. 3). Штамм 1.2 имеет уникальный набор признаков.

На дендрограмме рис. 4 выявлены пять кластеров. Первый (5.21, 19.21, 9.21, 18.21) и второй (12.21, 17.21, 1.21, 7.21) кластеры показывают близ-

кое сходство по всему ряду признаков. Признаки штамма 11.21 уникальны. Описание кластеров представлено в табл. 3.

Среди изученных образцов выделяются штаммы 5.20, 11.20, 13.20, 20.20 (2020 г.) и 3.21, 6.21, 14.21, 15.21 (2021 г.). Они имеют очень близкий генотип и сильно сходны по морфолого-культуральным признакам. Это обусловлено принадлежностью к одной популяции штаммов патогена, локализованной на условно выделенной территории. Эти штаммы были получены в зонах А и В [3].

Таблица 2. Описание выявленных кластеров

Номер штамма	Генотип	Культуральные признаки			
	A:B:C:D:E:F	характер	структура	рельеф	профиль
2020 г.					
1.20	137:172:177:209:186:220	Разнонаправленный	Клочковатая	Конический	Низкий
5.20	137:172:180:205:211:220	Зонированный	»	Бугристый	»
7.20	139:172:180:203:211:220	Равнонаправленный	Войлочная	Конический	Средний
10.20	139:172:180:203:211:220	»	»	»	»
11.20	137:172:180:203:211:220	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	Низкий
12.20	137:172:180:203:211:218	Равнонаправленный	Войлочная	Равномерный	»
13.20	139:172:180:203:211:220	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	»
16.20	139:172:180:203:211:220	Концентрический	Войлочная	Конический	Средний
20.20	137:172:180:203:211:220	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	Низкий
2021 г.					
1.21	135:172:180:207:211:218	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	Низкий
3.21	137:172:180:203:211:220	»	Войлочная	»	»
5.21	137:174:180:203:211:218	»	Клочковатая	»	»
6.21	137:172:180:203:211:220	»	Войлочная	»	»
7.21	157:172:180:205:211:218	»	Клочковатая	»	»
8.21	135:172:180:203:211:220	Равнонаправленный	Войлочная	Равномерный	»
9.21	139:172:180:203:211:218	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	Средний
11.21	129:174:177:217:219:222	Равнонаправленный	Однородная	Равномерный	Низкий
12.21	137:172:180:205:211:222	Зонированный	Клочковатая	Бугристый	»
13.21	141:172:180:203:211:220	Равнонаправленный	Пушистая	Равномерный	»
14.21	139:172:180:203:211:220	Зонированный	Войлочная	Бугристый	»
15.21	137:172:180:203:211:220	»	»	»	»
17.21	137:172:180:205:211:222	»	Клочковатая	»	»
18.21	139:174:180:203:211:220	»	»	»	»
19.21	137:172:180:203:211:218	»	»	»	»

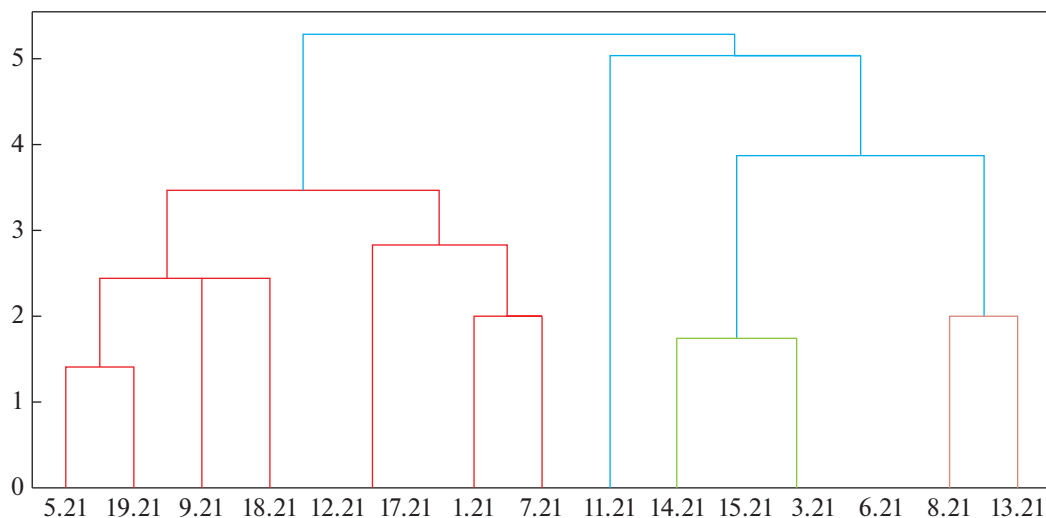


Рис. 4. Дендрограмма кластеризации штаммов, выделенных в 2021 г.

Таблица 3. Описание выявленных кластеров

2020 г.		
1	12.20	Генотип: (137):(172):(180):(203):(211):(218) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста войлочной структуры и равномерным рельефом низкого профиля
2	16.20 7.20 10.20	Генотип: (139):(172):(180):(203):(211):(220) Фенотип: колонии с равнонаправленным или концентрическим характером роста войлочной структуры и коническим рельефом среднего профиля
3	1.20	Генотип: (137):(172):(177):(209):(186):(220) Фенотип: колонии с разнонаправленным характером роста клочковатой структуры и коническим рельефом низкого профиля
4	13.20 5.20 11.20 20.20	Генотип: (137,139):(172):(180):(203,205):(211):(220) Фенотип: колонии с зонированным характером роста клочковатой структуры и бугристым рельефом низкого профиля
2021 г.		
1	5.21 19.21 9.21 18.21	Генотип: (137,139):(172,174):(180):(203):(211):(218,220) Фенотип: колонии с зонированным характером роста клочковатой структуры и бугристым рельефом низкого или среднего профиля
2	12.21 17.21 1.21 7.21	Генотип: (135,137,157):(172):(180):(205,207):(211):(218,222) Фенотип: колонии с зонированным характером роста клочковатой структуры и бугристым рельефом низкого профиля
3	11.21	Генотип: (129):(174):(177):(217):(219):(222) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста однородной структуры и равномерным рельефом низкого профиля
4	14.21 15.21 3.21 6.21	Генотип: (137,139):(172):(180):(203):(211):(220) Фенотип: колонии с зонированным характером роста войлочной структуры и бугристым рельефом низкого профиля
5	8.21 13.21	Генотип: (141,135):(172):(180):(203):(211):(220) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста пушистой или войлочной структуры и равномерным рельефом низкого профиля

Таблица 4. Популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav., распространенные на территории рисосеяния Краснодарского края [3]

Номер популяции	Зона	Признаки
I	А, В, С	Генотип: (135,137,139,157):(172,174):(180):(203,205,207):(211):(218,220,222) Фенотип: колонии с зонированным характером роста клочковатой структуры и бугристым рельефом низкого профиля
II	А, В	Генотип: (137,139):(172):(180):(203,205):(211):(220) Фенотип: колонии с зонированным характером роста клочковатой структуры и бугристым рельефом низкого профиля
III	А, В	Генотип: (139):(172):(180):(203):(211):(220) Фенотип: колонии с равнонаправленным или концентрическим характером роста войлочной структуры и коническим рельефом среднего профиля
IV	В, С	Генотип: (141,135):(172):(180):(203):(211):(220) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста пушистой или войлочной структуры и равномерным рельефом низкого профиля
V	В	Генотип: (137):(172):(180):(203):(211):(218) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста войлочной структуры и равномерным рельефом низкого профиля
VI	В	Генотип: (137):(172):(177):(209):(186):(220) Фенотип: колонии с разнонаправленным характером роста клочковатой структуры и коническим рельефом низкого профиля
VII	В	Генотип: (129):(174):(177):(217):(219):(222) Фенотип: колонии с равнонаправленным характером роста однородной структуры и равномерным рельефом низкого профиля

На протяжении всего периода исследований в зоне В выявлялись уникальные штаммы с отличным от других набором генетических и морфологических признаков (штаммы 1.20 и 11.20). Это может быть обусловлено высокой степенью естественного полиморфизма патогена.

Также на протяжении двух лет выявлялись группы штаммов с близкими признаками и неселективные по зоне отбора. Достаточно близкое сходство штаммов по генотипу показывает низкий уровень изменчивости патогена на террито-

рии рисосеяния и, скорее всего, обусловлено локализацией популяций.

Таким образом можно выделить семь популяций патогена, распространенных на территории рисосеяния Краснодарского края (табл. 4).

Исследовательская работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/3.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубина Е.В., Харченко Е.С., Серая Л.И. и др. База данных "Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России". 2019. Свидетельство № 2019620149.
2. Фролова В.С., Коваленко Е.Д., Наскидашвили Ж.Г. и др. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике. М.: ВАСХНИЛ, 1983. 14 с.
3. Nartymov D., Dubina E., Kharitonov E. et al. Zoning of rice growing territory of Krasnodar region by the set of features of *Pyricularia oryzae* Cav. isolation // BIO Web of Conferences. 2022. V. 51. 04006. 9 с. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20225104006>
4. Nartymov D., Kharitonov E., Dubina E. et al. Studying of cultural properties of *Pyricularia oryzae* Cav. strains in the south of Russia // Microbiol. Res. 2021. V. 12. № 1. P. 21–28. <https://doi.org/10.3390/microbiolres1201000310.3390/microbiolres12010003>
5. Истомин Н.К., Нартымов Д.В., Дубина Е.В. и др. Изучение наиболее оптимальных методов кластеризации морфологических и культуральных признаков // Научно-практ. журн. "Рисоводство". 2021. № 3(52). С. 22–26. <https://doi.org/10.33775/1684-2464-2021-52-3-22-26>

Studying the Genetic Diversity of the Rice Break Cause *Pyricularia oryzae* Cav. on the Complex of Molecular and Morphological Features

D. V. Nartymov^a, E. V. Dubina^{a, b, *}, M. G. Ruban^a, Yu. V. Aniskina^c, S. V. Garkusha^{a, b}, I. A. Shilov^c, N. S. Velishaeva^c, O. S. Kolobova^c, and N. K. Istomin^a

^aFederal Scientific Rice Centre, Krasnodar, 350921 Russia

^bTrubilin Kuban State Agrarian University, Krasnodar, 350004 Russia

^cAll-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

*e-mail: lenakrug1@rambler.ru

On the basis of molecular genetic approaches, the study of the biodiversity of the phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae* Cav. in the south of Russia and a classification of the morphological and cultural characteristics of the pathogen was carried out. For 2020–2022 monitoring was carried out and 24 strains of the pathogen were isolated from the affected herbarium material collected from the fields of five ecological rice growing zones of the Krasnodar Territory (Krasnoarmeisky, Kalininsky, Abinsky, Slavyansky districts, Krasnodar). Using the multiplex PCR system developed by us based on fragment analysis, five genotypes were identified among the studied *Pyricularia oryzae* Cav. strains over the entire period of the project, each of which is characterized by a unique genetic profile. Compiled their "DNA passport". The studied isolates of the causative agent of blast were characterized by morphological and cultural characteristics. Six morphotypes of the pathogen have been identified.

Keywords: genetic biodiversity, phytopathogenic fungi, *Pyricularia oryzae* Cav. (blast), pathotype, strains, SSR loci, PCR, DNA passports.