РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ ФУЗАРИОЗНОГО УВЯДАНИЯ И МЕЛОЙДОГИНОЗА НА ДЫНЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИМ ГРИБОМ *APHANOCLADIUM ALBUM* MX-95

Gallo M.¹, Sasanelli N.², Ciccicarese F.¹, Мигунова В. Д.³,
Toderas I.⁴, Konrat A.³, Rusu S.⁴, Iurcu-Straistaru E.⁴

Аннотация

Использование биологических агентов является одной из перспективных стратегий регуляции популяций вредителей, оказывающих наименьшее влияние на окружающую среду. Эксперимент с использованием хитинолитического гриба *Aphanocladium album* MX-95 (AA MX-95) был проведен на растениях дыни в условиях теплицы с естественным фоном заражения *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* и южной галловой нематодой *Meloidogyne incognita* в Валенцано (Провинция Бари, Апулия). Суспензия изолята MX-95 (2 x 10⁷ CFU/mL) была добавлена в концентрации 2.5 л/участок при помощи пластиковых труб, снабженных эмиттерами для воды (в соответствии с каждым растением дыни в ряду). Суспензия гриба была добавлена за 2 недели до посадки растений и после посадки 3 раза через каждые 2 недели. Также был вариант с обработкой только после посадки (3 обработки). Контрольные варианты включали в себя необработанную почву и почву с диазометом (600 кг/га), распределенную за 30 дней до посадки. Варианты с AA MX-95 значительно снижали фузариозное увядание, особенно когда обработка была до посадки и после, значительно эффективнее чем с химическим контролем диазомет (фунгицид и нематодцид). Влияние гриба, внесенного до и после посадки растений, особенно проявилось на развитии мелойдогиноза. Индекс галлообразования и популяционная численность нематод в конце эксперимента в почве были снижены на 50 и 63% соответственно по сравнению с контролем.

¹ University "A. Moro", Di.B.C.A.A. (Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari, Italy)

² Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione delle Piante (Via G. Amendola 122/D, 70126 Bari, Italy) (nicola.sasanelli@ipsp.cnr.it)

³ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, г. Москва, Большая Черёмушкинская ул., д. 28)

⁴ Institute of Zoology (MECC) (St. Academiei 1, 2028 Chisinau, Republic of Moldova)

Эффективность внесенного АА МХ-95 до и 3 раза после посадки растений была схожа и не отличалась от варианта с химическим стандартом диазомет.

Ключевые слова: *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, *Meloidogyne incognita*, биологическая регуляция, агент, хитинолитический грибок.

REGULATION OF THE DEVELOPMENT OF FUSARIOUS DRYING AND MELOYDOHYNOSIS ON THE MELON WITH THE CHITINOLYTIC MUSHROOM *APHANOCLADIUM ALBUM* MX-95

Gallo M.¹, Sasanelli N.², Ciccicarese F.¹, Migunova V. D.³,
Toderas I.⁴, Konrat A.³, Rusu S.⁴, Iurcu-Straistaru E.⁴

Abstract

The use of biological agents is one of the promising strategies for the regulation of populations of pests that have the least impact on the environment. An experiment using the chitinolytic fungus *Aphanocladium album* MX-95 (AA MX-95) was carried out on melon plants in a greenhouse with a natural background infection of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* and the Southern Gall nematode *Meloidogyne incognita* in Valenzano (Province of Bari, Apulia). A suspension of MX-95 isolate (2 x 10⁷ CFU / mL) was added at a concentration of 2.5 l / plot using plastic tubes fitted with water emitters (according to each melon plant in the row). The suspension of the fungus was added 2 weeks before planting and after planting 3 times every 2 weeks. There was also an option with processing only after landing (3 treatments). Control options included untreated soil and a soil with a diazomet (600 kg / ha), distributed 30 days before planting. Versions with AA MX-95 significantly reduced fusarial wilt, especially when the treatment was before and after planting, much more effective than with chemical control of the diazomet (fungicide and nematicide). The effect of the fungus, introduced before and after planting, was especially manifested in the

¹ University "A. Moro", Di.B.C.A.A. (Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari, Italy)

² Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione delle Piante (Via G. Amendola 122/D, 70126 Bari, Italy) (nicola.sasanelli@ipsp.cnr.it)

³ All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – Branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences" (Bolshaya Cheryomushkinskaya st., 28, Moscow, 117218)

⁴ Institute of Zoology (MECC) (St. Academiei 1, 2028 Chisinau, Republic of Moldova)

development of meloydohynosis. The index of galling and the population number of nematodes at the end of the experiment in the soil were reduced by 50 and 63%, respectively, compared with the control. The effectiveness of the AA MX-95 applied before and 3 times after planting was similar and did not differ from the chemical standard diazomet.

Keywords: *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, *Meloidogyne incognita*, biological control agent, chitinolytic fungus.

Введение. Галловая нематода (*Meloidogyne spp.*) в сочетании с фузариозным увяданием, вызываемым *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, вызывает значительный урон урожаю садовых культур. Основные средства борьбы с нематодой и почвенными патогенами осуществляется химическими препаратами, в частности фумигированием почвы. В последнее время увеличивается внимание к применению экологически безопасных, безвредных для здоровья человека средств, требующих поиска новых недорогих стратегий, являющихся альтернативой химическому контролю. Штамм гриба *Aphanocladium album* Мх-95 (АА МХ-95) показал значительный эффект при биологическом контроле мучнистой росы на томатах, кабачках и огурцах, вызываемой *Oidium lycopersici* и *Sphaerotheca fusca* соответственно. Также этот штамм был эффективен при контроле одновременного поражения томатов галловой нематодой *Meloidogyne incognita* и почвенным патогеном *Pyrenochaeta lycopersici*. *A. album* — это микопаразит, продуцирующий гидролитические ферменты и в частности — хитиназы, которые разрушают полностью или частично клеточную стенку многих паразитов и фитопатогенных грибов.

В данном исследовании приведены результаты тепличного опыта, проведенного для оценки возможности использования *A. album* МХ-95 для биологической регуляции совместного заражения растений дыни *Cucumis melo* галловой нематодой *Meloidogyne incognita* и почвенным фитопатогенным грибом *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*. за счет его высокой хитинолитической активности.

Материалы и методы. Песчанная почва в теплице в Валенцано (Провинция Бари, регион Апулия, южная Италия) (41.030139 С, 16.901894 В) с естественным фоном *F. oxysporum f.sp. melonis* (FOM) и нематодой *Meloidogyne incognita* была глубоко вспахана и перемешена, с последующим разделением на делянки площадью 6.7 м². Блоки были распределены рандомизированно по 4 повторности на каждый вариант (рис. 1А). Полупогруженная ирригационная система (20 см глубиной) была подведена к каждому участку при помощи труб диаметром

1.6 см, снабженных водяными эмиттерами (скорость потока 4 л/час). Следующие варианты были представлены: а) новый биологический агент АА МХ-95 добавленный 2 недели до посадки и 3 раза после посадки растений (каждые 2 недели) и б) АА МХ-95 внесенный только после посадки растений (3 обработки каждые 14 дней). Контролем служила необработанная почва и почва, обработанная диазометом 600 кг/га (внесенного за 30 дней до посадки).

Рис. 1. Опыт на растениях дыни, зараженной *Meloidogyne incognita* и *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (А). Корни, пораженные *M. incognita* (В). Сосудистое обесцвечивание растений дыни (С)

АА МХ-95 выращивали *in vitro*. Мицелий растворяли в стерильной воде и засевали на картофельно-декстрозный агар в чашки Петри. Чашки инкубировали при 24°C в темноте в течение 7 дней. Мицелий затем гомогенизировали в стерильной воде с ПАВ для дисперсии высоко гигроскопичных конидий. Затем определяли концентрацию инокулюма, доводя его разбавлением до концентрации 2×10^7 КОЕ/мл в стандартной конидиальной суспензии. Суспензия затем подавалась в ирригационную систему в количестве 2.5 л/участок.

Одномесячные растения дыни (сорт Джалетто Ругозо из Козенцы) высаживали в каждый участок по 3 ряда (5 проростков/ряд), отделенных друг от друга метровым расстоянием. Растения выращивали в теплице 3 месяца. В период роста растения выращивали в соответствии с принятой практикой в этом регионе. Урожай собирали 3 раза и суммировали для расчета полного рыночного урожая.

Корни растений отделяли для определения индекса галлообразования (ГИ). Галлы, образуемые в результате поражения корневой системы галловой нематодой, оценивали по шкале от 0 до 5 баллов (0 – отсутствие галл и 5 – корневая система полностью деформирована большим количеством галл) (Lamberti, 1971) (рис. 1В). Степень поражения растений фузариозным увяданием оценивали по трехбалльной шкале. Стебель каждого растения разрезали поперечно на высоте 3 см от поверхности почвы и степень поражения сосудистого обесцвечивания (% пораженной площади) была оценена по шкале 0–3 балла (Longo et al., 2003) (рис. 1С). Нематод выделяли из почвенных образцов из каждого участка, используя 500 мл смешанной навески методом Кулена (Coolen, 1979).

Обработку данных проводили при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и используя метод сравнения средних (Дункан тест множественных диапазонов). Все статистические анализы проводили в программе PlotIT.

Результаты исследований. Обработка растений АА МХ-95 значительно увеличила рыночный урожай по сравнению с необработанным контролем (рис. 1). Не наблюдали достоверных отличий между вариантами с *A. album* МХ-95 и химическим стандартом диазомет ($P < 0.05$) (рис. 2).

Рис 2. Влияние различных обработок с хитинолитическим грибом *Aphanocladium album* МХ-95 на урожай дыни (сорт Джалетто Ругозо из Козенцы), выращенной в почве, зараженной *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* и *Meloidogyne incognita*

Данные в колонках, отмеченные одними и теми же буквами статистически не значимы (Дункан тест, $P < 0.05$)

Поражение растений фузариозным увяданием было значительно снижено в варианте с применением АА МХ-95, когда гриб вносили до и после посадки растений, по сравнению с необработанным контролем ($P < 0.01$) (табл. 1).

Однако варианты с грибом и химическим стандартом (диазомет) не отличались.

Симптомы сосудистого обесцвечивания в двух вариантах с грибом АА МХ-95 были значительно меньше, чем в необработанном контроле. Между вариантами с внесением АА МХ-95 после посадки растений и химическим стандартом (диазомет) не было статистических отличий ($P < 0.01$) (табл. 1).

Наибольшее влияние АА МХ-95 оказал на популяцию галловых нематод. Между вариантами с АА МХ-95 и диазометом не было статистических отличий при анализе индекса галлообразования, хотя только в варианте с обработкой АА МХ-95 до и после посадки растений обнаруживались статистические отличия (в варианте с грибом индекс галлообразования был ниже, чем в необработанном контроле). В вариантах с грибом (АА МХ-95) и диазометом популяционная численность нематод была значительно ниже, чем в контроле, хотя между собой варианты с биологическим и химическим препаратами не отличались ($P = 0.01$) (табл. 1).

Основываясь на результатах эксперимента, установлено, что поражение фузариозным увяданием положительно коррелировало с индексом галлообразования ($r^2 = 0.98$ и $r^2 = 0.93$, соответственно) (рис. 3). Следовательно, поражение фузариозным увяданием связано с пищевой активностью личинок галловой нематоды *M. incognita* на корнях растений дыни. Питаясь на корнях, личинки открывают новые ворота для проникновения в корневые ткани инфекции, вызванной *F. oxysporum f.sp. melonis*.

Заключение. Внесение АА МХ-95 до и после посадки растений может быть рекомендовано как эффективный метод биологической борьбы при одновременном заражении растений *F. oxysporum f.sp. melonis* и *M. incognita*. Внесение через ирригационную систему является наиболее эффективным способом применения гриба. Этот способ снижает расходы на производство, так как может быть повторен несколько раз для разных типов обработки культуры (защита, удобрение, ирригация).

Таблица 1

Влияние *Arhanocladium album* МХ-95 на поражение дыни *Ficarium oxysporum f.sp. melonis* и *Meloidogyne incognita* (сорт Джалетто Рутозо из Козенцы)

Обработка	Кол-во обработок	Концентрация	<i>Ficarium oxysporum f.sp. melonis</i>		<i>Meloidogyne incognita</i>		
			Индекс увядания (0-3)	Обесцвечивание сосудов (0-3)	Индекс галлообразования (0-5)	Конечная популяционная численность (яйца и личинки/мл почвы)	
Необработанный контроль	---	---	2.1*	2.2	4.1	13.6	A
Диазомет	30 дней до посадки растений	600 кг/га	1.8	2.0	2.8	3.3	B
<i>Arhanocladium album</i> МХ-95	14 дней до посадки растений + 3 раза после посадки каждые 2 недели	2.5 л/делянка	1.5	1.4	2.0	5.0	B
<i>A. album</i> МХ-95	3 раза после посадки каждые 2 недели	2.5 л/делянка	1.8	1.9	3.1	5.2	B

Примечание: * Среднее из 4 повторностей (15 растений/повторность);

** Данные, обозначенные теми же буквами статистически не отличаются (Дункан тест, $P < 0.01$).

Рис. 3. Связь между индексом галлообразования, являющимся следствием поражения корней *Meloidogyne incognita*, и индексом увядания (А) и обесцвечиванием сосудов (В), вызванным поражением корней дыни *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*

References

1. Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), Systematics, Biology and Control. London, UK, Academic Press, Lamberti F., Taylor C. E. (Eds), P. 317–329.
2. Lamberti, F. 1971. Results of nematicidal control on levantin tobacco in the province of Lecce. II Tabacco, 738: 5–10 (in Italian).
3. Longo, O., Ambrico, A., Polignano, G., Ciccarese, F. 2003. Promising resistance sources to race 1-2 of *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* in *Cucumis melo* germplasm. Italus Hortus, 10: 30–33.
4. Sasanelli, N., Ciccarese, F., Papajova, I. 2008. *Aphanocladium album* by via sub-irrigation in the control of *Pyrenochaeta lycopersici* and *Meloidogyne incognita* on tomato in a plastic house. Helminthologia 45: 137–142.