

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКОГЕЛЬМИНТА *Aphelenchoides saprophillus*
ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОРАЖЕНИЯ РОЗОВОЙ СНЕЖ-
НОЙ ПЛЕСЕНЬЮ (*Microdochium (Fusarium) nivale* (Fr.) Samuels & I.C.
Hallet) ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

А.Г. ЩУКОВСКАЯ¹

младший научный сотрудник

О.Б. ТКАЧЕНКО¹

доктор биологических наук

А.А. ШЕСТЕПЁРОВ²

доктор биологических наук, профессор

¹ Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, 127276,
Ботаническая ул., 4, e-mail: otkach@postman.ru;

² Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии
им. К.И. Скрябина, Москва, 117218, ул. Б. Черёмушкинская, 28,
e-mail: vigis@ncport.ru

Разработан метод выделения, культивирования и применения культуры нематод *Aphelenchoides saprophillus* для биологической борьбы с возбудителем розовой снежной плесени озимой пшеницы. Выделение нематод *A. saprophillus* из растений и почвы проводили методом Бермана. *A. saprophillus* лучше размножаются на мицелии гриба *Alternaria tenuis*. *A. tenuis* культивировали на картофельно-глюкозном агаре в термостате при t 26–27 °С в течение 5–10 сут. Нематод вносили по 100 особей в пробирку с культурой грибов, где в течение 30–40 сут их число увеличивалось в 100 раз. Нематод от культуральной среды очищали методами смыва и Бермана. Суспензию нематод разводили водой и применяли из расчета 1 л на 1 м² обрабатываемой площади с помощью садового опрыскивателя в первой декаде октября. Аналогично культивировали нематод *A. saprophillus* на культуре гриба *Microdochium nivale*. Внесение нематод *A. saprophillus* в дозе 160000 тыс. экз./м² посевов озимой пшеницы позволяет снизить степень болезни весной в 3 раза, что способствует повышению урожайности на 14,4 %.

Ключевые слова: озимая пшеница, мицелий, грибы, *Alternaria tenuis*, *Microdochium nivale*, нематода, *Aphelenchoides saprophillus*, розовая снежная плесень.

Розовую снежную плесень (РСП) озимой пшеницы вызывает гриб *Microdochium (Fusarium) nivale*. Это заболевание широко распространено на посевах злаковых на территории РФ. Развитие мицелия гриба начинается в осенне-зимний период под снеговым покровом при температуре от 0 до 2 °С [2]. Развиваясь на листьях растений пшеницы, под снегом, гриб нарушает ход физиологических процессов, вызывает ослабление иммунитета. В период весенней вегетации ослабленные и поражённые РСП растения озимой пшеницы сильно отстают в росте, не имеют боковых побегов, не кустятся, вследствие чего происходит нарушение формирования полноценного урожая.

Вредоносность РСП проявляется в изреживании посевов, а нередко полной их гибели (рис. 1).

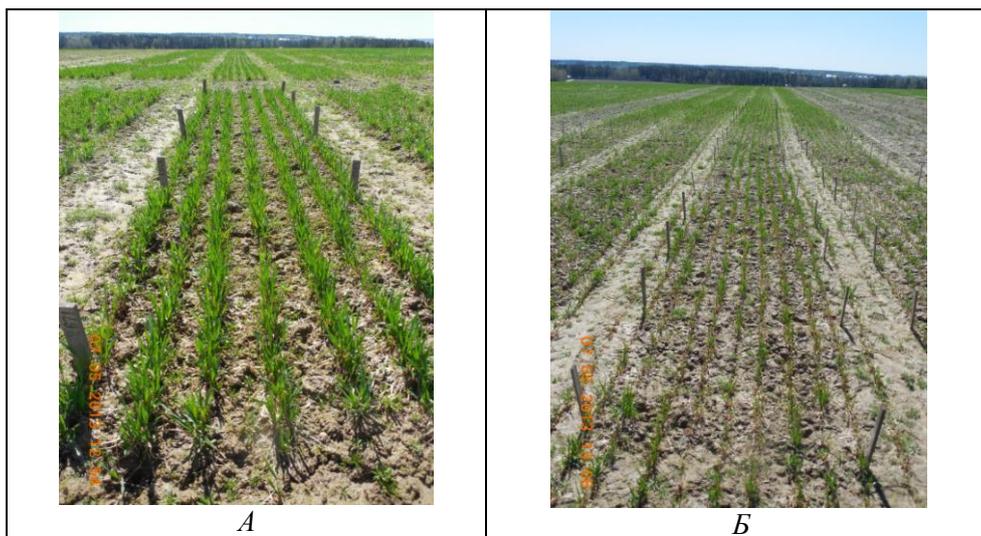


Рис. 1. Внешне здоровые растения озимой пшеницы (А) и растения, поражённые розовой снежной плесенью (Б)

Потери урожая при этом могут достигать 20–50 %. Сложность проведения защитных мероприятий связана с тем, что активность патогена происходит в период, когда непосредственная обработка растений затруднена или невозможна. Летом обработки фунгицидами и проведение агротехнических мероприятий против гриба *M. nivale*, находящегося в стадии покоя, не эффективны. Для подавления РСП химические фунгициды применяют с середины сентября до начала октября, когда температура воздуха в дневные часы составляет не менее 10 °С, а после обработки в течение суток не должно быть осадков. Использование фунгицидов при температуре ниже 10 °С не эффективно, т. к. они теряют свои защитные свойства [1]. К тому же применение фунгицидов имеет много отрицательных сторон.

Из растений озимой пшеницы, поражённой РСП, выделили микогельминт *A. saprophillus*, который при низких температурах не теряет своей активности. Этот вид прокалывает стилетом стенки гиф мицелия и всасывает его содержимое в пищевод. Повреждённый мицелий истекает соком, т. е. теряет жидкость, в результате чего погибает.

Целью нашей работы была разработка метода выделения, культивирования и применения микогельминта *A. saprophillus* для биологической борьбы с возбудителем розовой снежной плесени озимой пшеницы.

Биология и экология исследуемых объектов

Microdochium (Fusarium) nivale

Анаморфа – *Microdochium (Fusarium) nivale*

Телеоморфа – *Calonectria graminicola* (Berk et Br.) Wollenenw.

Поражение озимых происходит с осени. На нижних листьях появляются расплывчатые водянистые пятна, от небольших (0,3–0,7 см в диаметре) до сплошных. Затем на них образуется мицелий, на котором развивается конидиальное спороношение гриба. Поражённые листья и целые растения склеены между собой бело-розовым мицелием в виде сплошной паутинистой плёнки (рис.1). В период весенней вегетации при холодной погоде в загущенных посевах *M. nivale* вызывает загнивание основания стеблей, что ведёт к «подсушке» растений. Такие растения не выколашиваются или дают полупустой колос, в котором формируется неполноценное зерно. В период цвете-

ния – восковой спелости на стеблях, во влагищах листьев формируются перитеции *S. graminicola*. Вначале они светло-коричневые или красноватые, но по мере созревания темнеют и становятся бурыми. Стебель в местах образования перитециев обесцвечивается и приобретает розоватую окраску. Мицелий распространяется по листьям, склеивая их. Гриб, переходя с одного растения на другое, захватывает большие участки поля.

Заражение происходит от инфекции, находящейся в почве, на остатках растений (мицелий, конидии, аскоспоры в перитециях) и в семенах (мицелий в оболочках семени, реже споры). Конидии гриба веретёновидные, изогнутые, бесцветные (в массе розовые), размером $14\text{--}25 \times 3\text{--}4$ мкм. Кроме конидиального спороношения, гриб образует сумчатую стадию (стадия покоя) в виде поверхностных перитециев располагающихся в нижней части стебля. Аскоспоры заражают верхние листья последующих верхних ярусов весной и летом во влажный и прохладный период. Перитеции шаровидно конические кирпично-красные. Аски булабовидные, с тонкой оболочкой, размерами $50\text{--}70 \times 8\text{--}10$ мкм, 6–8 споровые. Зрелые аскоспоры эллипсоидальные, прямые или согнутые, гладкие с 1–3 перегородками.

Aphelenchoides saprophillus Franklin, 1957. (Барановская, 1981; Шестепёров, 1980) (рис. 2).

Класс – Nematoda

Подкласс – Secernentea

Отряд – Tylenchida

Подотряд – Aphelenchina

Подсемейство – Aphelenchoidea

Надсемейство – Aphelenchoidinea

Род – Aphelenchoides

Жизненный цикл микогельминта – 8–15 сут.

Самки. L = 0,43–0,53 мм; a = 26–33 (28); b = 8–12 (9,5); c = 12–18 (16); V = 66–70 %; копьё – 11–13 мкм. Число яиц, откладываемых одной самкой, – 60. Эмбриональное развитие – 2–3 сут. Яйца – 46×18 мкм.

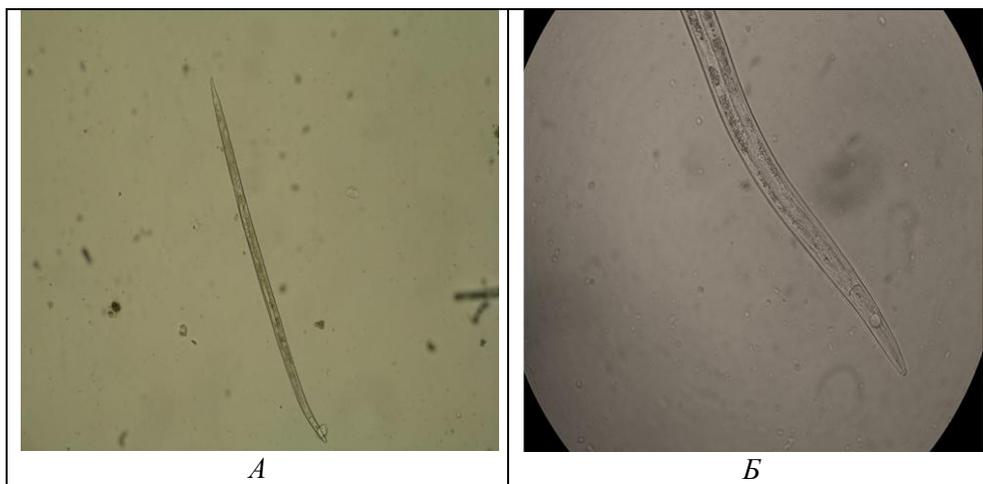


Рис. 2. Микогельминт *Aphelenchoides saprophillus* (А – общий вид нематоды, Б – головной отдел нематоды, в которой расположен стилет) (сканирующий электронный микроскоп с замораживающей приставкой криоскан)

Тело стройное, суживается к обоим концам. Головная капсула обособленная, лабиотуберкулы шире основания головной капсулы. Кутикула тонкокольчатая, ширина колец 0,7–0,9 мкм. Боковое поле 1/5 диаметра тела с 4 линиями. Прокорпус цилиндрический, метакорпальный бульбус округлой формы. Нервное кольцо расположено сразу же за метакорпальным бульбусом. Экскреторная пора на уровне нервного кольца. Длина пищеводных желез со-

ставляет 3,5 диаметра на уровне заднего края метакорпального бульбуса. Яичник продольный. Ооциты расположены в один ряд, в зоне созревания в два ряда. Задняя матка 2–2,5 диаметра в области вульвы. Хвост слегка загнут на брюшную сторону, конический, оканчивается туповатым мукро.

Самцы. L = 0,48–0,63 (0,55) мм; a = 27–34 (30); b = 8–11 (9); c = 13–18 (15); спикулы (с дорсальной стороны) – 23 мкм; копьё – 12 мкм.

Самцы с типичными афеленхоидными спикулами. Рулѣк отсутствует. В боковом поле 4 линии. Хвост слегка загнут. Мукро простое.

Материалы и методы

Методика выделения микогельминтов из растений и почвы

Для извлечения нематод из разных частей растений и почвы применяли модифицированный метод Бермана. Навески, очищенные от лишней примеси, раскладывали слоем 3–5 мм на ватном фильтре в сите. Сито вставляли в воронку диаметром 12–15 см, на растрѣб которой надевали кусок резинового шланга длиной 10–15 см. В нижний конец трубки помещали энтомологическую пробирку для сбора выделенных нематод. Затем в воронку заливали водопроводную воду так, чтобы жидкость покрыла насыпанную на сито массу. Продолжительность экспозиции для растений составляет 24, почвы 48 ч. При определении нематод учитывали число самок, самцов и личинок. При изучении материала под микроскопом суспензию нематод из энтомологической пробирки наносили на предметное стекло, просматривали и определяли виды.

Микотрофные нематоды лучше всего размножаются на мицелии гриба *Alternaria tenuis* Nees (Шестепѣров, 1995).

*Методика культивирования *Aphelenchoides saprophillus* на грибе *Alternaria tenuis**

В качестве питательного субстрата для культивирования гриба использовали картофельно-глюкозный агар (картофель очищенный – 200 г, агар – 20 г, глюкоза – 20 г на 1 л воды). Для выращивания культуры гриба применяли биологические пробирки на 20 мл и биологические матрасы на 2 л с ватно-марлевыми пробками. В пробирки наливали по 10 мл среды, в матрасы – по 200 мл. Пробирки и матрасы с горячей средой после автоклавирования при 1 атм. в течение 45 мин наклоняли таким образом, чтобы субстрат полностью покрывал поверхность ёмкостей. Гриб, посеянный на питательный субстрат уколом, выращивали 5–10 сут в термостате при температуре 26–27 °С. Нематод в грибные культуры вносили после того, как разросшийся грибной мицелий покрыл всю поверхность питательного субстрата. В одну пробирку вносили 100 особей. Пробирки хранили в термостате при температуре 27 °С. Через 30–40 сут получали по 3000–5000 нематод. В биологические матрасы помещали по 300–500 нематод. Через 30–40 сут число их возрастало в 80–100 раз.

Методика очистки нематод от культуральной среды

Для очистки нематод от частиц мицелия гриба сначала смывали их несколько раз со стенок пробирок и биологических матрасов. Затем полученную суспензию нематод пропускали через вороночный анализ Бермана с использованием гигроскопической ваты и подсчитывали их число.

*Методика культивирования *Aphelenchoides saprophillus* на мицелии гриба *Microdochium nivale* в условиях *in vivo**

Из суспензии нематод отбирали по 100 экз. и пересаживали их в пробирки с мицелием гриба *M. nivale*, после чего их оставляли при температуре 12–18 °С. Когда мицелий гриба был съеден весь, нематод выделяли вороночным методом и переносили по 100 экз. на пробирку с мицелием гриба *M. nivale*. Пробирки с нематодами хранили при трех разных температурах: 5 °С – климокамера; 15 °С – климокамера; 27 °С – термостат. Каждые 2 недели визуально отслеживали состояние мицелия, а после того как мицелий полностью исчезал с поверхности питательной среды, нематод выделяли и подсчитывали.

*Методика подготовки водной суспензии микогельминта
Aphelenchoides saprophillus*

По мере съедания мицелия гриба нематоды смывали со стенок пробирок биологических матрасов в одну ёмкость и доводили до объёма 1 л (для удобства подсчёта). Полученный раствор тщательно перемешивали на магнитной мешалке и подсчитывали число нематод в 1 мл (1 мл $\approx \pm 100$ экз. нематод).

Готовую суспензию переливали в пластиковые бутылки (ёмкостью 5 л) и транспортировали к месту назначения.

*Методика применения водной суспензии микогельминта
Aphelenchoides saprophillus*

Ёмкости с водной суспензией выдерживали 2–4 ч для выведения нематод из обездвиженного состояния, в которое нематоды часто впадают при неблагоприятных условиях. После выдержки водную суспензию разводили водой до необходимого объёма, который определяется площадью полива. Рекомендуемая норма расхода суспензии на 1 м² обрабатываемой площади – 1 л раствора.

Полученный раствор взбалтывали и заливали в ручной садовый опрыскиватель с давлением не больше трех атмосфер, с которого предварительно удалили вращающиеся сетки форсунок, т. к. на них могли остаться нематоды при внесении. Обрабатываемую площадь до и после внесения раствора проливали обычной водой, облегчая тем самым проникновение нематод. При распылении раствора поливочное отверстие шланга помещали у поверхности почвы, исключая попадание раствора на листья растений, т. к. на листьях нематоды погибают.

Обработку посевов озимой пшеницы проводили в первой декаде октября (не раньше), когда дневная температура воздуха в течение 3 сут составляла 8–10 °С.

Представленные результаты исследований обработаны статистически в программе Microsoft Excel (Statistica).

Результаты и обсуждение

В проведённых нами лабораторных опытах микогельминт *A. saprophillus* был внесен в количестве 100–200 экз. на пробирку на мицелий гриба *M. nivale* при температурах 5 °С, 15 °С и 27 °С. Температура 5 °С оказалась наиболее благоприятной для культивирования *A. saprophillus*. Коэффициент размножения при этой температуре у *A. saprophillus* был 6,5, при этом микогельминты использовали все представленные пищевые ресурсы в течение 50–75 сут. При температуре 15 °С скорость размножения *A. saprophillus* уменьшилась и коэффициент размножения составил 5,7, что естественным образом сказалось на численности популяции (табл. 1). В конце эксперимента в пробирках, хранившихся при температуре 15 °С, были отмечены единичные погибшие особи, что не наблюдали в пробирках при температуре 5 °С. При температуре 27 °С у *A. saprophillus* не зарегистрировано размножения.

1. Влияние температуры на размножение *A. saprophillus* при культивировании на мицелии гриба *Microdochium nivale*

Вид микогельминтов	Температура, °С		
	5	15	27
<i>Aphelenchoides saprophillus</i>	661	570	146*

Примечание. * – $P < 0,05$.

Анализ полученных данных по культивированию *A. saprophillus* на мицелии гриба *M. nivale* показал, что температура влияла на размножение микогельминта и на сроки использования представленных пищевых ресурсов. Установлено, что температура 5 °С (близкая к температуре под снежным покровом) является благоприятной для размножения *A. saprophillus*, а его общая численность при данной температуре была достаточно высокая.

Проведённые нами мелкоделяночные полевые опыты показали, что внесение осенью *A. saprophillus* на посевы озимой пшеницы, поражённой РСП, уменьшило степень поражения болезнью весной следующего года.

2. Влияние численности микогельминтов на развитие РСП озимой пшеницы

Число растений, шт./м ²	Число продук. стеблей, шт./м ²	Высота растений, см	Длина колоса, см	Число зерен в колосе, шт.	Масса зерна в колосе, г	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, ц/га
Контроль (гриб <i>M. nivale</i> без внесения нематод)							
73,5±13,4	270,2±15,2	74,5±6,3	7,95±0,8	23,7±1,9	2,7±1,8	47,4±4,6	68±6,3
Гриб <i>M. nivale</i> + <i>A. saprophillus</i> (38000 тыс. экз.)							
321±15,6	326±14,0	100,7±7,0	7,87±0,9	23,75±2,0	2,2±1,9	47,7±4,5	71,1±7,0
Гриб <i>M. nivale</i> + <i>A. saprophillus</i> (80000 тыс. экз.)							
38,7±14,3	333,7±15,5	101,7±5,7	8,5±0,8	25,5±2,1	2,2±1,9	44,7±4,4	78,2±7,1
Гриб <i>M. nivale</i> + <i>A. saprophillus</i> (160000 тыс. экз.)							
45,2±16,2	344,5±16,4	104±5,2	8,37±0,8	23,7±2,0	2,3±2,0	48,8±4,5	79,4±7,2

Примечание. * – P < 0,05.

В наших экспериментах внесенные нематоды существенно снижали степень развития заболевания и улучшали показатели продуктивных качеств растений озимой пшеницы, что в свою очередь влияло на повышение урожая.

В варианте, где было внесено 160000 тыс. экз. нематод, процент развития РСП составил всего 20,5 %, тогда как в контроле развитие болезни было в 2,5 раза больше (табл. 3). В вариантах с численностью внесения 80000 тыс. экз. и 38000 тыс. экз. нематод развитие болезни составило 26 и 31,25 % соответственно. В контроле поражённые растения имели меньшее число продуктивных стеблей по сравнению с вариантом *M. nivale* + *A. saprophillus* (160000 тыс. экз.) – 344,5 экз.. Отмечено снижение массы зерна в колосе, массы 1000 зёрен (47,45 г – контроль и 48,8 г в варианте *M. nivale* + *A. saprophillus* (160000 тыс. экз.).

Расчет биологической эффективности показал (табл. 3), что в варианте, где была внесена максимальная концентрация микогельминтов 160000 шт./м² биологическая эффективность – 62,7 %, в варианте с концентрацией 80000 шт./м² – 52,7 %, а с концентрацией 38000 шт./м² – 43,1 %. В варианте, где вносили нематод в максимальной концентрации, хозяйственная эффективность выше на 6,7 %, в сравнении с вариантом, где вносили среднюю концентрацию и 45,3 %, где вносили минимальную концентрацию микогельминтов.

3. Биологическая и хозяйственная эффективность применения суспензии микогельминта *A. saprophillus* на растениях озимой пшеницы, поражённой РСП

Вариант	Биологическая эффективность, %	Поражение РСП, %	Хозяйственная эффективность, %	Урожайность, ц/га
<i>M. nivale</i> (контроль)	0	55	0	68
<i>M. nivale</i> + (38000 экз./делянка)	43,1	31,25	4,3	71,1
<i>M. nivale</i> + (60000 экз./делянка)	52,7	26	13,04	78,2
<i>M. nivale</i> + (160000 экз./делянка)	62,7	20,5	14,45	79,4
НСР ₀₅	–	–	–	10

Таким образом, методика культивирования микогельминта *A. saprophillus* позволяет наработать суспензию нематод, содержащую большое число особей. Применение методики внесения водной суспензии на основе *A. sa-*

saprophyllus в осенний период на посевах озимой пшеницы позволяет снизить степень развития болезни весной с 65 до 20,4 %, что, в свою очередь, способствует повышению урожая и продуктивных качеств пшеницы.

Литература

1. Andreeva E.I., Molchanov O.Ju. Snezhnaja plesen' ozimyh zernovyh (metody izuchenija i mery bor'by). Obzorn. inf. Ser. «Himicheskie sredstva zashhity rastenij». – М.: НИИТЖИМ, 1987. – 45 с.
2. Bilaj V.I. Fuzarii. – Kiev: Naukova dumka, 1977. – 412 с.
3. Shestepjorov A.A., Savotikov Ju.F. Karantinnye fitogel'mintozy. Kn. 1. – М.: Kolos, 1995. – 463 с.

Methods of use of mycohelminth *Aphelenchoides saprophyllus* for decrease of degree of damage on winter wheat infected with pink snow mold (*Fungus microdochium (Fusarium) Nivale (Fr.) Samuels & I.C. Hallet*)

A.G. Shchukovskaya
junior research associate

O.B. Tkatchenko
doctor of biological sciences

Federal State Budget Institution of Science
N.V. Zizin Main Botanic Garden RAS

Moscow, 127276, Botanicheskaya ul., 4. E-mail: otkach@postman.ru

A.A. Shesteporov

doctor of biological sciences, professor

State Scientific Institution All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology named after K.I. Skryabin, 117218, Moscow, B. Cheremushkinskaya, 28, tel./fax 8-499-124-56-55, e-mail: vigis@ncport.ru

Pink snow mold of winter wheat is caused by the fungus *Microdochium (Fusarium) nivale*. This disease is widely spread within Russian Federation on grain varieties; its injuriousness is expressed in planting destruction and rather often in total crop failure. In our laboratory experiments the mycohelminth *Aphelenchoides saprophyllus* Franklin was put in number of ± 100 –200 examples per test tube (20 × 200 mm) on mycelium of fungus *M. nivale* at temperature 5, 15 and 27 °C. The temperature 5 °C was more favorable for cultivation of mycohelminth *A. saprophyllus* on mycelium of fungus *M. nivale*. At this temperature the reproduction ratio of *A. saprophyllus* was 6,5, while mycohelminth was used by whole foods available (mycelia of fungus гриба *M. nivale*) within 50–75 days. However at temperature 15 °C the speed of reproduction of *A. saprophyllus* slowed down (reproduction ratio 5,7) that naturally affected the population size. At the end of experiment single dead species were found in test tubes stored at temperature 15 °C, that cannot be observed in test tubes stored at temperature 5 °C. At the same time reproduction of *A. saprophyllus* was not registered at temperature 27 °C. Methods of cultivation of *A. saprophyllus* allows to create suspension of nematodes containing a large number of species. Applying in autumn water suspension made on the base of *A. saprophyllus* on winter wheat allows to decrease the degree of spread of disease in spring from 65 up to 20,4 % which improves the productivity index of wheat and affect crop improvement.

Keywords: mycohelminths, pink snow mold, winter wheat, mycelium, *Alternaria tenuis*, *Microdochium nivale*, *Aphelenchoides saprophyllus*.