

**ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ
ГОНЧАРА**

**Біолого-екологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології**

Кваліфікаційна робота

другий (магістерський) рівень вищої освіти
спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

**«Вдосконалення технології отримання біопрепарату для захисту
рослин від хвороб на основі грибів роду *Trichoderma*»**

Виконавець:

студентка групи БН-18-1

Бойко Дар'я Олегівна

(підпис)

Керівник:

к.б.н., доцент кафедри

мікробіології, вірусології та біотехнології

Скляр Тетяна Володимирівна

(підпис)

Завідувач випускової кафедри

мікробіології, вірусології та біотехнології

к. б. н., доцент

Скляр Тетяна Володимирівна

(підпис)

Дніпро 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота магістра містить: 65 с., табл.5, рис.17, джерел 75.

Об'єктом дослідження було вдосконалення технології виробництва біопрепарату для захисту рослин на основі грибів роду *Trichoderma*.

Метою дипломної роботи було вдосконалення технології отримання різних форм біопрепарату на основі грибів р. *Trichoderma* для захисту рослин від хвороб.

Для вирішення поставлених завдань було застосовано методи визначення антагоністичної активності (метод агарових блоків, метод бінарної культури), метод визначення фітотоксичності мікроорганізмів, ваговий метод визначення біомаси, визначення кількості колонієутворюючих одиниць висівом десятикратних розведень на щільні поживні середовища, мікроскопічні та статистичні методи.

Одержані результати та їх новизна: досліджено антагоністичну активність трьох штамів *Trichoderma* відносно фітопатогенних бактерій та грибів і обрано *Trichoderma viride* КМВ-F-15, як штам, що має найвищий антагоністичний потенціал; не виявлено фітотоксичної дії культуральної рідини *Trichoderma viride* КМВ-F-15 на проростання насіння ячменя ярого; досліджено утворення конідій *Trichoderma viride* КМВ-F-15 за двоетапної технології отримання біопрепарату, а також перевірено антагоністичну активність та життєздатність *Trichoderma viride* КМВ-F-15 при її зберіганні у торф'яному препараті.

Отримані результати є науковою основою для створення та удосконалення біопрепаратів для захисту сільськогосподарських рослин від хвороб та шкідників.

Ключові слова: МІКРОМІЦЕТИ, *TRICHODERMA*, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ФІТОПАТОГЕНИ, ФІТОТОКСИЧНІСТЬ, ТОРФ'ЯНИЙ ПРЕПАРАТ.

RESUME

The master's qualification work contains: pages 65, table 5, fig. 17, sources 75.

The object of the study was the improvement of the technology for the production of a biopreparation for plant protection based on fungi of the *Trichoderma* genus.

The aim of the diploma thesis was to improve the technology of obtaining different forms of biopreparations based on *Trichoderma* fungi for the protection of plants from diseases.

Methods for determining antagonistic activity (agar block method, binary culture method), a method for determining phytotoxicity of microorganisms, a weight method for determining biomass, determining the number of colony-forming units by sowing tenfold dilutions on dense nutrient media, microscopic and statistical methods were used to solve the tasks.

The obtained results and their novelty: the antagonistic activity of three *Trichoderma* strains against phytopathogenic bacteria and fungi was investigated and *Trichoderma viride* KMB-F-15 was chosen as the strain with the highest antagonistic potential; no phytotoxic effect of *Trichoderma viride* KMB-F-15 culture liquid on the germination of spring barley seeds was detected; the formation of *Trichoderma viride* KMB-F-15 conidia was investigated using the two-stage technology of obtaining a biopreparation, and the antagonistic activity and viability of *Trichoderma viride* KMB-F-15 when stored in a peat preparation was also tested.

The obtained results are a scientific basis for the creation and improvement of biological preparations for the protection of agricultural plants from diseases and pests.

Key words: MICROMYCETES, *TRICHODERMA*, ANTAGONISTIC ACTIVITY, PHYTOPATHOGENS, PHYTOTOXICITY, PEAT PREPARATION.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Загальна характеристика представників роду <i>Trichoderma</i>	7
1.2 Поширення грибів роду <i>Trichoderma</i>	9
1.3 Ферменти та вторинні метаболіти грибів роду <i>Trichoderma</i>	10
1.4 Мікопаразитизм.....	15
1.5. Практичне значення грибів <i>Trichoderma viride</i>	18
1.5.1 Використання <i>T. viride</i> в рослинництві	18
1.5.2. Застосування <i>Trichoderma viride</i> в промисловості	20
1.5.3. Використання грибів роду <i>Trichoderma</i> в медицині	22
1.6 Особливості культивування <i>Trichoderma</i>	24
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	27
2.1 Об'єкт дослідження	27
2.2 Поживні середовища	28
2.3 Методи визначення антагоністичної активності грибів роду <i>Trichoderma</i> та визначення фітотоксичності триходерми	29
2.4 Метод дослідження утворення конідій <i>Trichoderma viride</i> КМВ-F-15 за двоетапної технології отримання біопрепарату	30
2.5. Отримання та зберігання торф'яного препарату	31
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	32
3. Антагоністична активність трьох штамів <i>Trichoderma</i> відносно різних фітопатогенів та перевірка відсутності фітотоксичності обраного штаму.....	32
3.2. Дослідження утворення конідій <i>Trichoderma viride</i> КМВ-F-15 за двоетапної технології отримання біопрепарату.....	38
3.3. Зберігання торф'яного препарату <i>Trichoderma viride</i> КМВ-F-15	49
ВИСНОВКИ.....	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	57

ВСТУП

Біологічна продукція, включаючи біодобрива, біостимулятори, біогербіциди та продукти біологічного контролю, є багатомільйонною індустрією і, за прогнозами, стане найрозвинітішою найближчі кілька років. Використання хімічних пестицидів має бути обмежено до абсолютного мінімуму у зв'язку з негативними впливами на довкілля та здоров'я людей і тварин.

Існує декілька стратегій відходу від хімічного захисту рослин, одна з яких – це використання біопрепаратів на основі грибів *Trichodermaspp.* Ці біопрепарати знайдуть широке застосування в органічному землеробстві для боротьби з хворобами рослин різної етіології, де вони мають шанс забезпечити повний захист без застосування хімічних пестицидів. У свою чергу стійкість мікроміцетівроду *Trichoderma* до хімічних пестицидів дозволить поєднувати ці гриби в препаратах з низькими концентраціями нововведених і модифікованих хімічних пестицидів, які у цілому будуть більш безпечні для навколишнього середовища [1].

Знання властивостей триходерми, включаючи метаболічну активність і тип взаємодії з рослинами та іншими мікроорганізмами, може забезпечити її ефективне використання в сільському господарстві, як біопрепарат захисту рослин від широкого спектру фітопатогенів, а також від комах-шкідників [2].

Мета роботи – вдосконалити технологію отримання різних форм біопрепарату на основі грибів р. *Trichoderma* для захисту рослин від хвороб.

Для досягнення мети в роботі вирішувалися наступні завдання:

1. Здійснити відбір штаму *Trichoderma sp.*, що характеризується високою антагоністичною активністю до широкого кола збудників хвороб рослин та визначити його вплив на проростання насіння ярого ячменю.
2. Дослідити утворення конідій, життєздатність та фунгістатичну активність густої біомаси *Trichoderma sp.*, вирощеної в глибинних умовах у різних поживних середовищах, для вдосконалення двоетапної технології отримання препарату на основі конідій.
3. Дослідити вплив оцтової кислоти на життєздатність та утворення конідій густою біомасою *Trichoderma sp.*, вирощеної в глибинних умовах у різних поживних середовищах.
4. Дослідити зберігання торф'яної форми препарату *Trichoderma sp.* в залежності від складу поживного середовища, в якому отримують біомасу гриба в глибинних умовах перед внесенням у торф.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика представників роду *Trichoderma*

Trichoderma — це рід ниткоподібних грибів, які демонструють різноманітний спосіб життя та взаємодію з іншими грибами, тваринами та рослинами [3].

Даний гриб є анаморфою аскоміцетів роду *Hypocrea*, що формують зморшкувату, яскраво забарвлену або незабарвлену щільну стромату, діаметр якої перевищує 5 мм, хоча деякі види утворюють стромати паличкоподібної форми чи овоїдні діаметром кілька сантиметрів у розмірі. Рід *Hypocrea* зазвичай характеризується тим, що види формують перитеції, оточені щільними строматами, що складаються із псевдопаренхіми або ущільнених гіфів. Види *Hypocrea* утворюють 8 аскоспор з однієюперетяжкою, що знаходяться в одній оболонці на ранніх етапах розвитку. Аскоспори безбарвні чи зелені, рано розпадаються на дві округлі, яйцеподібні, витягнуті або клиноподібні аскоспори, часто неоднакові за формою. Таким чином, сумки містять 16 аскоспор [4].

Види *Trichoderma* виробляють широкий спектр пігментів від зеленувато-жовтого до червоного кольору, хоча деякі - безбарвні. Подібним чином, конідіальна пігментація варіюється від безбарвного до різних зелених відтінків, а іноді також сірого або коричневого. Крім пігментації, ідентифікація видів у роді затруднена через вузький діапазон варіацій морфології *Trichoderma* [5].

Рід *Trichoderma* включає велику кількість штамів грибів, які діють як агенти біологічного контролю, антагоністичні властивості яких засновані на активації багатьох механізмів. Штами *Trichoderma* здійснюють біоконтроль проти грибкових фітопатогенів або опосередковано, конкуруючи за поживні речовини і простір, змінюючи умови навколишнього середовища, або

сприяючи росту рослин і захисним механізмам рослин і виробленням антибіотиків, або безпосередньо, за допомогою таких механізмів, як мікопаразитизм. Ці непрямі та прямі механізми можуть діяти координаційно, і їх важливість у процесі біоконтролю залежить від штаму *Trichoderma*, гриба-антагоніста, рослини та умов навколишнього середовища, включаючи доступність поживних речовин, рН, температуру та концентрацію заліза. Активація кожного механізму передбачає вироблення грибом специфічних сполук і метаболітів, таких як фактори росту рослин, гідролітичні ферменти, сидерофори, антибіотики, а також пермеази вуглецю та азоту. Ці метаболіти можна або надлишково виробляти, або комбінувати з відповідними штамми біоконтролю, щоб отримати нові рецептури для більш ефективного контролю хвороб рослин і застосування після збору врожаю під час його зберігання [6].

Було виявлено, що ці метаболіти не тільки безпосередньо пригнічують ріст і патогенну діяльність паразитів, але й підвищують стійкість до хвороб, запускаючи систему захисту в рослині-хазяїні. Крім того, ці метаболіти також здатні посилювати ріст рослин, що дозволяє рослині протидіяти хворобі компенсаторним вегетативним зростанням за рахунок посиленого росту кореневої та пагонної систем [7].

Гриби роду *Trichoderma* також добре відомі як продуценти ферментів, функція яких полягає в розщепленні полімерних органічних молекул до більш доступних для поглинання сполук. Крім того, вони також виділяють білки, які можуть діяти як токсини або сигнали для спілкування з партнерами-мутуалістами. Зрозуміло, що життєво важливою властивістю будь-якого опортуніста, включаючи *Trichoderma*, є вдала комбінація чудової здатності розкласти декілька полімерів і асоціюватися (у широкому сенсі) з іншими мікроорганізмами. Тому інвентаризація секретому організму може виявити його потенційні екологічні адаптації [8].

Гриби роду *Trichoderma* – це дуже велика група мікроорганізмів, які відіграють значну роль у навколишньому середовищі. Кілька видів *Trichodermaspp.* позитивно впливає на рослини, стимулюючи їх ріст, і

захищаючи від грибкових і бактеріальних патогенів. Вони використовуються в біологічному захисті рослин як біофунгіциди, а також у біоремедиації. Представники роду *Trichoderma* також використовуються в різних галузях промисловості – головним чином у виробництві ферментів, антибіотиків та інших метаболітів, а також біопалива. В даний час представники роду *Trichoderma* розглядаються науковцями з позицій геноміки та протеоміки. Частина послідовностей геному цього організму стали загальнодоступними. Ось чому, гриби *Trichoderma* мають потенціал для потреб людини ще більшою мірою, ніж раніше. Тим не менш, необхідні подальші дослідження для підвищення ефективності та безпеки застосування цих грибів[9].

1.2 Поширення грибів роду *Trichoderma*

Гриби *Trichoderma* поширені в усіх кліматичних зонах. *Trichoderma* це вільноживучий вид, що поширений в ґрунтових і корневих екосистемах. Цей грибок є умовно-патогенним симбіонтом рослин, а також є паразитом інших грибів. Принаймні деякі штами створюють міцні та тривалі колонізації поверхонь коренів і проникають в епідерміс і кілька клітин нижче цього рівня. Вони виробляють або вивільняють різноманітні сполуки, які викликають локальну або системну резистентність, і це пояснює відсутність патогенності для рослин [10].

Триходерма є домінуючим компонентом мікобіому різних ґрунтових екосистем (таких як сільськогосподарські угіддя, прерії, ліси, солончаки та пустелі) у всіх кліматичних зонах, включаючи помірні та тропічні регіони, Антарктиду та тундру. Зазвичай види *Trichoderma* виділяють із ґрунту, хоча вони часто спорулюють на деревині, на капелюшках культурних грибів, де їх можна визначити з легкістю по масі конідій, забарвлених у зелений колір, рідше у білий та жовтий кольори. Ще вони зустрічаються на вологих стінах будівель [4]. Деякі гриби отримують як ендofіти з лікарських рослин. Ендofітнігриби,

які гармонійно живуть у внутрішніх тканинах своїх господарів, не викликаючи явних захворювань, вважаються багатим джерелом нових метаболітів з чудовою фармакологічною активністю. Окрім того, даний вид грибів було отримано з морського середовища, включаючи водорості, губки, м'які корали, мангрові зарості та інші морські середовища [11].

1.3 Ферменти та вторинні метаболіти грибів роду *Trichoderma*

Ферменти, що секретуються *Trichoderma*, характеризуються складністю будови. Є здатність різних штамів до секреції: ендохітіназ, хітобіозидаз, β -N-ацетилгексозамінідаз, N-ацетил- β -галактозамінідаз, β -1,3-глюкозаз, β -1,6-глюканаз, протеаз, ДНКаз, α -амілаз, целюлаз, ліпаз, ксиланаз, уреаз, РНКаз, пектиназ, лакказ, пероксидаз та мутаназ. До основних відносяться літичні ферменти, такі як целюлази, ксилази, глюканази, протеази, хітинолітичні ферменти [12].

Гриби роду *Trichoderma* активно синтезують целюлазу і здатні доруйнування клітинної стінки рослин, так і окремих складних полісахаридів: целюлози, геміцелюлози, пектина до мономерних форм [13].

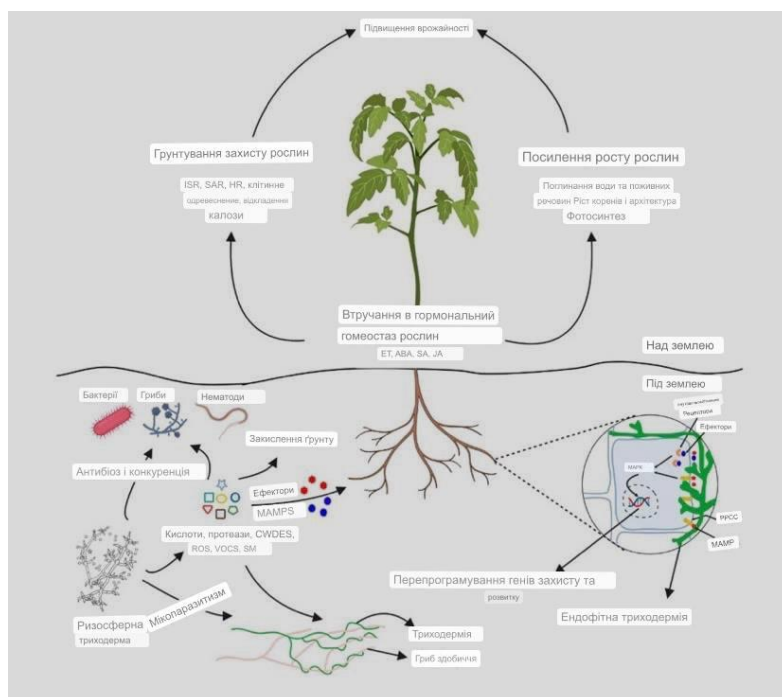
Гриби *Trichoderma viride* має целюлолітичний потенціал для використання в біопроцесах, які спрямовані на отримання ферментів для подальшого використання для біоперетворення целюлози в глюкозу. Цей виділений фермент демонструє активність у порівнянні з комерційним ферментом целюлази. Синтез целюлаз грибами з лігноцелюлозних залишків має великий інтерес, що представляє собою пошук відновлюваних джерел для заміни викопних енергетичних джерел [14].

Саме конідії *Trichoderma* містять цілий ряд ензимів, які здатні гідролізувати широке коло різноманітних полісахаридів. Конідіальні целюлази можуть служити альтернативою для деградації целюлази в умовах дефіциту поживних речовин. Вони розташовуються на поверхні конідій.

Відповідно целюлази, які зв'язані з конідіями, можуть ініціювати деградацію молекул целюлози, тим самим генеруючи індуктори біосинтеза целюлаз, і ведуть до росту на середовищі, що містить целюлозу [15]. Штами роду *Trichoderma*, є найкращими продуцентами целюлаз, але окрім цього є ефективними продуцентами інших гідролаз полісахаридів, включаючи геміцелюлозолітичні ферменти [16].

Стосовно хітинолітичних ферментів *Trichoderma*, то вони мають значний вплив на комах, а саме на лускокрилих. Біологічний аналіз підтвердив ці результати і показав, що пероральне введення суміші ферментів викликає зміни, що призводять до несприятливих наслідків для росту і розвитку личинок, негативно впливає на масу лялечки і навіть викликає її смертність [17].

Окрім ферментів, гриби роду *Trichoderma* здатні виділяти вторинні метаболіти, до яких відносяться антибіотики, фітогормони, вітаміни, органічні кислоти, амінокислоти [4]. Різні види грибів *Trichoderma* виділяють велику кількість метаболітів, маючи мінімальні потреби в поживних



речовинах (рис. 1.1).

Рис. 1.1 Схематичне зображення взаємодії триходерми з різними рослинними патогенами [18].

Ці метаболіти можна використовувати для сільськогосподарських, промислових та медичних цілей, а отже, вони важливі для людей [19]. Серед антибіотиків, які продукуються триходермами, відомо більше ста представників. Серед них: харзіанові кислоти, трихолін, пептаїболи, 6-пептил- α -пірон, вірідин, гліовірин, глізопреніни, гептелідова кислота, стероїди, сесквітерпени тощо [2]. Кілька видів *Trichoderma* spp. проявляють протигрибкову та протибактеріальну дію проти фітопатогенних грибів та бактерій, в якій можуть бути задіяні різні групи вторинних метаболітів, такі як терпени, пірони, гліотоксин, гліовірин і пептайболи [18].

Протибактеріальні вторинні метаболіти. Результати різних досліджень показали, що вторинні метаболіти, що виділяються різними видами *Trichoderma* мають потенціал пригнічувати ріст двох економічно важливих патогенних бактерій рослин, *R. solanacearum* і *X. Compestris* [20].

Наприклад, *T.harzianum* контролює *Clavibactermichiganensis* шляхом виробництва лізосиму [21]. Запобігають росту *Erwiniaamylovora* та *C. michiganensis* invitro, продукуючи вірідіофунгін А [22].

У *Trichoderma* spp. були виявлені різні пептайболи, такі як трихоконін VI та VII, які є причиною пригнічення росту бактерій [22]. Біоактивні сполуки пошкоджують бактеріальні клітини за різними механізмами. Алкалоїди можуть інгібувати важливі ферменти або діяти як агенти, що інтеркалюють ДНК [23]. Деякі флавоноїди коагулюють розчинні білки бактеріальних клітин, включаючи важливі ферменти, утворюючи з ними комплекси [24]. Інші відповідають за руйнування мембрани та інгібування клітинної стінки та синтезу нуклеїнових кислот [25]. Лізозим впливає на стінки бактеріальної клітини та клітинну мембрану, що призводить до руйнування мембрани та вивільнення внутрішньоклітинного вмісту, як наслідок, призводить до загибелі бактеріальної клітини [26].

Противіробкові вторинні метаболіти. Токсичність епіполітідіоксопіперазину (ЕТР) пояснюється їхніми дисульфідними містками, які зв'язуються з тіоловими групами і генерують активні форми кисню через окислювально-відновні цикли, і таким чином інактивують білки [27].

Гліотоксини виявляють біологічну активність проти патогенного для людини гриба *Aspergillus fumigatus*, але також відіграють важливу роль у біоконтрольній активності *Trichoderma virens* проти деяких патогенних грибів рослин [28]. Гліовірини це аналоги гліотоксину, які виявляють противіробкову активність щодо *R. Solani* та *Pythium ultimum* [29].

Пептайболи

Пептайболи — це лінійні пептиди, що складаються з α, α -діалкілованих амінокислот, ізоліну, α -аміно ізобутирової кислоти, ацетильованого *N*-кінця та *C*-кінцевого аміноспирту. Вони є екологічно та комерційно важливими через те, що у них є здатність індукувати системну резистентність рослин проти мікробної інвазії. Пептайболи мають амфіпатичний характер і самозбираються, утворюючи залежні від напруги іонні канали в мембранах. Ця здатність значною мірою відповідає за антибіотичні властивості цих сполук [29, 30]. Перший відкритий пептайбол, аламетицин F30 з *T. viride* [31].

Різні види пептайболів продемонстрували антимікробну активність широкого спектру проти ряду важливих патогенів рослин, таких як

R. solani, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* та *Botrytis cinerea*. Окрім противіробкової та противіробкової дії у пептайболів спостерегається противірусний механізм. Противірусні властивості пептавірину використовувалися проти інфекції тютюнової мозаїки на рослинах тютюну [32].

Пірони

Пірон 6-пентил-2H-піран-2-он (6-PP) є ароматизатором, який відповідає за аромат кокоса і має противіробкову дію та активність, що

сприяє росту рослин [33]. Його використовують проти гнилі різних фруктів та овочів, хвороб стовбурів виноградної лози та фузаріозе огірків[34]. Інший аналог пірону, віридепіронон, був синтезований штамом *T. viride* і показав 90% пригнічення росту *S. rolfsii* при мінімальній інгібуючій концентрації [35].

Трихолін

Було показано, що трихолін, білок, що інактивує рибосоми, виділений з культуральної рідини *Trichoderma viride*, надає фунгіцидну дію на *Rhizoctonia solani* через кінетичну взаємодію. Трихолін викликає паралельне припинення росту, поглинання амінокислот і біосинтезу білка. Спосіб дії трихоліну *in vivo* на синтез білка та ріст клітин пояснюється зменшенням утворення полісом у *R. solani* через пошкодження великих рибосомальних субодиниць[36]. Нематицидна активність та інсектицидні вторинні метаболіти.

Було виділено кілька нематицидних сполук, таких як оцтова кислота, у фільтраті культури *T. longibrachiatum*, та гліотоксин, виділений з великої кількості грибів, включаючи штам *T. viride* які були визначені як нематицидний засіб. Пептид циклоспорин А, що володіє нематицидною активністю проти кореневої нематоюди *M. incognita*, був отриманий з *T. polysporum*. Смертність *M. incognita* можна пояснити на основі розпаду тканин нематод. У попередніх дослідженнях повідомлялося, що застосування різних вторинних метаболітів проти *M. incognita* призводило до розпаду внутрішньої тканини нематод, що в кінцевому підсумку спричинило смерть [37].

Недавні дослідження продемонстрували, що *Trichoderma* може підвищити захист рослин від комах-шкідників, таких як тля, трипси, молі та гусениці. Триходерма безпосередньо впливає на шкідників за допомогою деяких антагоністичних механізмів, найважливішими з яких є паразитування та вироблення інсектицидних вторинних метаболітів, протиживних сполук і репелентів. Крім того, повідомляється, що *Trichoderma* безпосередньо

зменшує шкідливий вплив цих патогенів шляхом активації захисних механізмів рослин. *T. longibrachiatum* виявив ентомопатогенний вплив на розвиток *Leucinodes orbonalis*, одного з основних шкідників *Solanum melongena* (баклажан). Подальше дослідження показало, що спостерігався інтенсивний паразитарний ріст гіф *T. gamsii* через нижню частину живота та дихальний остиол личинки *Delia radicum*. Крім цього, *T. harzianum*, *T. asperellum* і *T. hamatum* виявили патогенний потенціал проти *Cetarovacuna lanigera* руйнівної комахи-шкідника цукрової тростини, яка відповідає за зниження якості, врожаю та вмісту цукру [33].

1.4 Мікопаразитизм

Гриби рода *Trichoderma* володіють паразитичними властивостями. Мікопаразитизм є одним з найважчих механізмів дії грибів рода *Trichoderma* на патогени. Даний процес складається із декількох стадій.

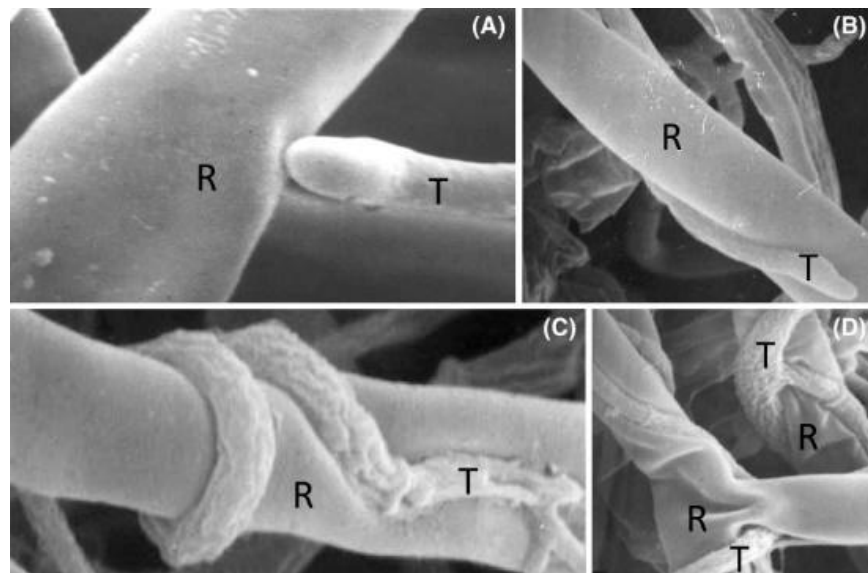


Рис.1.2 Стадії мікопаразитизму *Trichoderma* на *Rhizoctonia solani*
А-впізнання хазяїна, В-прикріплення, С-огорнення патогена, Д-знищення патогена[38].

При з'єднанні *Trichoderma* з гіфами патогена, утворює свої гіфи із огортанням гіфів патогена. Більшість коротких бокових відростків

закінчуються апресоріями, які приєднуються до гіфів патогена. Далі гіфи патогена окутуються гіфами *Trichoderma*, і починається синтез ферментів, які руйнують клітину стінку хазяїна. У місцях, де розташовуються апресорії є спеціальні отвори через які *Trichoderma* проникає до патогена[39].

Виділення молекулярних маркерів мікопаразитизма було б дуже перспективно у подальшому. В результаті росту *T. harzianum* на клітинній стінці *Rhizoctonia solani* в клітинах міцелія гриба виявлена індукція генів *ind1* і *ind11*. Продукти цих генів – білки, які гомологічні пермеазам, їх можна рахувати маркерами мікопаразитизма [8].

Гриби *Trichoderma* використовують різні складні прямі або непрямі механізми проти грибкових патогенів (рис. 1.3).



Рис. 1.3 Механізми біоконтролю, які використовуються представниками роду *Trichoderma* проти грибкових збудників[1].

Непрямий вплив на патогени включає вироблення ферментів, що руйнують клітинну стінку, синтез антибіотиків, конкуренцію за простір і поживні речовини (головним чином вуглець, азот і залізо), а також встановлення прямого паразитарного зв'язку з грибковим патогеном. З іншого боку, *Trichoderma* опосередковано індукує місцеву або системну резистентність рослин через продукти (елісатори), що вивільняються з

клітинних стінок рослини-хазяїна (ендоелісители) та інфікуючий мікроорганізм (екзоелісители)[1].

Противіробкову дію проти фітопатогенних грибів можна пояснити комбінованою дією вторинних метаболітів та гідролітичних ферментів. Було показано, що пригнічення проростання спор *B.cinerea* пояснюється синергетичним ефектом гліотоксину і ферментів ендохітинази. Гриби *Trichoderma* виділяють речовини, подібні до еліситорів, які викликають у рослин системну або локалізовану реакцію резистентності [40].

Відомо, що різні вторинні метаболіти, що продукуються *Trichoderma viride*, такі як гарціаноліди, пептайболи та певні леткі сполуки, мають противіробковий потенціал, а окрім цього діють як стимулятори росту рослин, що призводить до підвищення стійкості рослин до ураження патогенами. Наприклад, 6-PP, поряд зі зниженням росту міцелію *F. oxysporum*, *B. cinerea* та *R. solani*, також сприяє росту рослин та індукує системну резистентність, ймовірно, діючи як ауксин-подібна сполука [35].

Інша дія вторинних метаболітів для боротьби з фітопатогенними грибами є їхня роль у конкуренції за поживні речовини. Здатність грибів роду *Trichoderma* дуже швидко рости робить їх потенційними конкурентами за поживні речовини та простір. *Trichoderma viride* робить залізо недоступним для конкуруючих мікроорганізмів, вивільняючи сидерофори, які очищають залізо з навколишнього середовища. Було показано, що конкуренція за залізо відіграє важливу роль у антагоністичній активності *T. viride* проти *F. oxysporum*. Здатність триходерми обвиватися навколо гіфів гриба здобичі збільшує його мікопаразитарну активність [41].

Деякі вторинні метаболіти взаємодіють з токсинами патогенних грибів і пригнічують їх ріст. Наприклад, 6-PP, що виділяється *T. viride*, руйнує фузарінову кислоту та мікотоксини, відповідно цим пригнічує ріст міцелію *Fusarium moniliforme* [33].

Окрім цього деякі види триходерми не виділяють антибіотиків в культуральне середовище, але в той же час при внесенні культур в стерильне

середовище спостерігається зменшення загального числа мікроорганізмів. Це слугувало причиною для гіпотези існування летких антибіотиків [43].

Наприклад синтез аламетицина *T. viride* інгібує розвиток тільки грампозитивних бактерій. Має іонофорну дію, утворюючи в мембранах бактерій водневі канали змінного діаметра. В утворенні одного такого каналця бере участь 6 молекул антибіотика. Аламетицин індукуює проникність через мембрану катіонів та аніонів [44].

1.5. Практичне значення грибів *Trichoderma viride*

1.5.1 Використання *T. viride* в рослинництві

Останнім часом зросла кількість рослин, які загинули від раптового спалаху різноманітних хвороб, що в свою чергу призвело до неврожаю. Людство стрімко шукає способи вирішення цієї проблеми, не використовуючи хімічних речовин. Застосування триходерми є одним із способів розібратися із цим питанням.

Колонізація коренів сільськогосподарських рослин ендofітними грибами роду *Trichoderma* викликає активізацію генів і пігментів, які покращують фотосинтез рослин. При фізіологічному або екологічному стресі, рослини зазнають втрати своєї фотосинтетичної здатності через пошкодження фотосистем та інших клітинних процесів, спричинених активними формами кисню. Певні штами *Trichoderma* активують ці біохімічні шляхи, які зменшують активні форми кисню до менш шкідливих молекул. Цей механізм робить рослини більш стійкими до біотичних та абіотичних стресів [45].

Крім того, *Trichoderma* виділяє різні ауксини, які здатні стимулювати ріст рослин і розвиток коренів. Ефект, подібний до ауксину, спостерігався у стеблах гороху, оброблених гарціанолідом і 6-пентил- α -піроном, основними вторинними метаболітами, що продукуються різними штамами *Trichoderma*. Колонізація ризосфери

кукурудзи *T. viride* також викликає вищі темпи фотосинтезу та системне збільшення поглинання CO₂ листям [46].

Було проведено дослідження з метою вивчення антиоксидантних ферментів, індукованих *T. viride* як початкової захисної реакції під час інвазії збудника гнилі *Aspergillus niger* у п'яти сортах арахісу в горщиківій культурі. Обробка насіння *T. viride* зменшила на 51-58% захворюваність шийними гнилями у різних сортів арахісу під культурою ґрунту, інфікованому патогеном. Активність антиоксидантних ферментів, а саме супероксиддисмутази (SOD, EC 1.15.1.1) та аскорбатпероксидази (APX, EC 1.11.1.11), підвищувалась у відповідь на інфекцію патогеном у більш високих показниках у толерантних сортів (J-11 і GG-2) порівняно з чутливими (GAUG-10, GG-13, GG-20) та додатково індукованими обробкою *T. viride*. Обробка триходермою помітно підвищило SOD в 2,3 рази, GPX у 5 разів. Активність APX під час розвитку хвороби у толерантних сортів збільшувалася в 5 разів, а у сприйнятливих сортів – приблизно в 1,2, 1,5 та 2,0 рази. Загалом, у проростків, оброблених *T. viride*, була виявлена більш висока активність SOD (1,5 рази), GPX (3,25 рази) і APX (1,25 рази), ніж при обробці одним патогеном (T2), що можливо, свідчить про індукцію реакції антиоксидантного захисту триходермою для боротьби з окислювальним стресом, спричиненим проникненням патогена [8].

Також дослідженням геному роду *Trichoderma* були виявленні малі секретовані білки насичені цистеїном, які були схожі на еліситори. Один з них, *T. viride* Sm1 був детально вивчений, оскільки він індукує системну стійкість до хвороб у бавовни. Крім того, Sm1 необхідний для індукції системного захисту кукурудзи через шлях жасмонової кислоти. Тому відповідно, що ця група білків сприяє взаємодії *Trichoderma* з рослинами [47].

Trichoderma може слугувати як агент біоконтролю, так і біодобриво при вирощуванні багатьох рослин, зокрема рису. Значно вищу експресію деяких ферментів, пов'язаних зі стресом, спостерігали в рослинах рису,

оброблених *Trichoderma*, що сприяло зростанню кількості та якості врожаю як при біотичних, так і абіотичних стресах [48].

Показано, що гриб *T. viride* може використовуватися як біодобриво, яке ефективно зменшує викиди закису азоту (N_2O) із субтропічних чайних полів на півдні Китаю. Масове виробництво біодобрива на основі *T. viride* з використанням утилізації відходів (стічних вод та рисової соломи) було визнано економічно ефективним та можливим. Ця технологія вважається доцільною з огляду на зменшення втрат азоту з чайних полів у субтропічних районах центрального Китаю та зменшення забруднення від інших сільськогосподарських відходів [47].

Біопестицид на основі *T. viride* з наночастинками оксиду Титану (TiO_2) виявляв значну ларвіцидну активність щодо бавовняної совки *H. armigera*. Подальші дослідження показали, щомікогенні наночастинки були нетоксичними для дощових черв'яків *Eudriluseugeniae* та ґрунту в цілому, тому такий пестицид можна застосовувати для багатьох рослин [48].

Були створені трансгенні рослини, що експресують гени *Trichoderma*

Гени *Trichoderma* можуть функціонально експресуватися в рослинах для надання корисних властивостей, головним чином для контролю хвороб рослин. Були отримані високірівні експресії гена ендохітинази *T.*

harzianum chit42 в різних рослинних тканинах безвидимо впливають на ріст і розвиток рослин. Вибрані трансгенні лінії тютюну та картоплі були високотолерантними або повністю стійкими до листкових патогенів *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* та *B. cinerea*, а також до ґрунтового збудника *Rhizoctonia solani*. Інші гени хітинази *Trichoderma* були використані для створення трансгенних рослин, стійких до грибкових захворювань [49].

1.5.2. Застосування *Trichoderma viride* в промисловості

Біоконверсія лігноцелюлозної біомаси є енергоємним процесом через її гетерогенну структуру. Для вирішення цієї проблеми є ефективним метод попередньої (біологічної) обробки субстрату за допомогою *T. viride* для покращення коефіцієнта використання лігноцелюлозних субстратів під час ферментації. Вихід метану в результаті анаеробного розщеплення кукурудзяної соломи після попередньої обробки ферментами *Trichoderma viride* і *Aspergillus sp.* при різних співвідношеннях змішування (5/0, 4/1, 3/2, 2/3, 1/4, 0/5) збільшився у 3 рази [50].

Для підвищення виходу лимонної кислоти були створені нові гібриди *A. niger* та *T. viride* за допомогою генетичної рекомбінації через парасексуальний процес. *A. niger* зазвичай не може розкласти або засвоювати кристалічну целюлозу як єдине джерело вуглецю на відміну від грибів *Trichoderma*. Злиття протопластів у нитчастих грибів виявилось високоефективною процедурою отримання гібридів. Утворені штами отримали здатність розщеплювати целюлозовмісні субстрати й мали посилену продукцію лимонної кислоти порівняно з батьківськими штамми [47].

Очищення стічних вод різних видів промисловості із використанням *Trichoderma viride* є дуже ефективним етапом. Із озера, утвореного стоками шкіряного виробництва, було виділено два види грибів, ідентифікованих як *Penicillium citrinum* і *Trichoderma viride*, які демонстрували толерантність до концентрації Хрому Cr (VI) до 250 мг/л. Виявилось, що ці види грибів здатні адаптуватися до 500 мг/л Cr (VI), шляхом посилення експресії лаккази. Ці результати показують, що обидва види грибів мають великий потенціал для біоремедиації шкіряних стоків, які є великою проблемою для здоров'я та навколишнього середовища в регіоні Арекіпа. Відповідно із цього, *Trichoderma viride* має потенціал для концентрації та відновлення важких металів [51].

Trichoderma viride також широко застосовуються для виробництва харчових добавок та супутніх продуктів. У даний час різні

ферменти *Trichoderma* використовуються для покращення процесу пивоваріння (β -глюканази), як ферменти для мацерації у виробництві фруктових соків (пектинази, целюлази, геміцелюлази), як кормові добавки в тваринництві (ксиланази) та в корм для домашніх тварин. Целюлази в основному використовуються у випічці, солоді та виробництві зернового спирту. Однак не тільки ферменти, але і метаболіти триходерми використовуються як добавки. Цікавою ідеєю є застосування ферментів, що руйнують клітинну стінку, наприклад *T. harzianum*, як харчових консервантів через їх протигрибковий ефект. Зподібною метою *T. harzianum* мутаназуможна використовувати в зубній пасті, щоб запобігти накопиченню мутану в зубному нальоті [52].

1.5.3. Використання грибів роду *Trichoderma* в медицині

У медицині ензими і гени грибів роду *Trichoderma* можуть бути особливо корисним, так як вони мають сильну фунгіцидну активність і високий рівень синергізму з широко вживаними протигрибковими медичними препаратами, хоча про інші хітинолітичні ферменти такої інформації немає.

Ферменти можуть бути також використані для отримання детергентів і протопластів, по причині їх фунгіцидної активності, можуть використовуватися як стерилізувальні розчини.

Наприклад, *T. polysporum* продукує ліпофільний циклоспорин А. Він володіє різноманітними біологічними і фізіологічними діями: антипаразитичною, фунгіцидною, протизапальною та імуносупресивною властивостями. Циклоспорин А використовується в якості імуносупресорів після трансплантації органів і при лікуванні деяких аутоімунних порушень, таких, як псоріаз, atopічний дерматит, хвороба Бесета [52].

L-лізин-альфа-оксидаза, виділена із штаму *Trichoderma viride*, виявила ферментні властивості, придатні для хіміотерапевтичного препарату, який

використовується в експериментальній онкології. Експерименти показують, що основними механізмами протипухлинної дії L-лізин-альфа-оксидази є виснаження L-лізину, індукція окисного стресу та зниження концентрації поліамінів в організмі [53].

Біосинтез металевих наночастинок представляє великий інтерес у наноауці. Вони можуть бути синтезовані хімічно, фізично та біологічно. Біологічні методи мають ряд переваг: вони екологічно чисті, економічно ефективні, мають низьку токсичність, біосумісність та кращий контроль над розміром і формою. *T. viride* ефективними джерелами позаклітинних ферментів, які впливають на синтез наночастинок. Біомолекули, присутні в безклітинних екстрактах, здатні стабілізувати та синтезувати утворені наночастинок. Біосинтез наночастинок срібла або золота з використанням фільтрату *T. viride* (TVFSNP) може служити альтернативою антибіотикам та ефективною доставкою ліків для боротьби з раком та діяти як імуностимулятор [54].

Два нових аналога на основі сесквітерпену, а саме гарціанові кислоти А і В, були виділені з асоційованого з губкою гриба *Trichoderma harzianum*. Гарціанові кислоти А і В структурно охарактеризовані як сесквітерпен і норсесквітерпен з циклобутановим ядром, що рідко зустрічається в природі. Обидві сполуки виявляли інгібуючу активність щодо зниження рівнів РНК вірусу гепатиту С з низькою цитотоксичністю. Попереднє дослідження механізму дії сесквітерпену показало, що сполуки блокували етап проникнення вірусу гепатиту С у клітини [55].

Сарсайя та ін. вперше продемонстрували, що *Trichoderma* виробляє сполуку дендробін, відповідальну за підвищення імунітету людини, запобігання метастатичного раку та терапевтичний вплив на хворобу Альцгеймера. Крім цього, дендробін виявляв сильну токсичну активність щодо бактеріальних патогенів рослин, таких як *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

mycoides та *Staphylococcus*. Це вказує на потенційні можливості застосування метаболітів як у сільському господарстві, так і в медицині [56].

1.6 Особливості культивування *Trichoderma*

Гриби роду *Trichoderma* є цінним об'єктом біотехнології завдяки широкому спектру можливих змін, зокрема, на їх основі перспективним є отримання багатоцільових біопрепаратів для рослинництва [57].

Склад середовища та умови культивування грибів роду *Trichoderma* істотно впливають на їх ріст і життєздатність. Культивування грибів може проводитися двома способами: глибинним або поверхневим. Порівняно з глибинним методом, поверхневий має нижчі витрати та вищу продуктивність, а вироблені пропагули є стабільнішими, простішими та мають дешевшу подальшу обробку, менший скид стічних вод та менші потреби в енергії. Однак процеси глибиного культивування менш трудомісткі, їх легше контролювати та автоматизувати [58].

При культивуванні поверхневим способом гриби вирощують на поверхні щільного, сипкого середовища або тонкому шарі рідкого середовища, при цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з газової повітряної фази. При підборі живильного середовища для поверхневого твердофазного культивування намагаються використати комплексні натуральні живильні середовища, що мають у своєму складі як джерело вуглецю, так і джерело азоту.

Щодо сипучих середовищ, то для культур характерне утворення більшої кількості конідій, що обумовлює біофунгіцидну активність. В якості субстрату використовують зерна, які звожують, стерилізують та інокують культурою триходерми та інкубують від 10 до 15 днів. В результаті чого з'являється темно-зелене спорове покриття на насінні. Ці зерна можна подрібнити і використовувати для обробки насіння або

збагачення ґрунту. Культивування на сипучих субстратах значно вигідніше [59].

Вуглець є одним із основних елементів для росту та розвитку всіх живих організмів і грибів у тому числі. При використанні глюкози, фруктози, сахарози або крохмалю спостерігається висока швидкість росту культури у порівнянні з целюлозою чи лактозою. Потрібно наголосити, що при виборі джерела вуглецю необхідно враховувати штамоспецифічність даного гриба. D-фруктоза, D-манноза, D-галактоза, D-ксилоза, декстрин краще засвоюються у більшості вивчених видів, але зустрічаються випадки коли сахароза і гліцерин засвоюються краще.

Як джерело азоту серед органічних речовин можна виділити L-аланін, L-аспарагінову кислоту, L-глутамінову кислоту, а щодо неорганічних – нітрат натрію, нітрат калію, нітрат та сульфат амонію. Відзначено найкраще зростання мікроміцетів на середовищах, що містять нітрат та сульфат амонію.

Важливими фізико-хімічними факторами середовища для накопичення максимальної кількості біомаси є кислотність середовища, температура та аерація. Максимальне зростання грибів спостерігається при рН в межах від 3,7 до 4,7. Для різних видів *Trichoderma* оптимальна температура росту відрізняється і лежить у межах від 22 до 34 °С. Гриби роду *Trichoderma* є аеробами, тому особливо важливий режим аерації. Оптимальна швидкість перемішування становить 200 об/хв.

Освітлення синього кольору та ближнього ультрафіолету, мінеральні елементи живлення (йони кальцію) та співвідношення вуглецю та азоту в складі живильного середовища (C:N = 160:1) сприяють індукції процесу спороутворення грибів [60].

Культивування на агаризованому середовищі. Для нарощування культури *T. viride* використовується картопляний агар з декстрозою (КДА), який розливається по 20 мл у стерилізовані чашки Петрі. Блоки чистих культур віком 3 дні, діаметром 5 мм розташовують в центр чашки Петрі.

Блоки чистих культур відділяються за допомогою пробкового каналу, стерилізуючи над полум'ям. Інокульовані чашки Петрі зберігають в термостаті при температурі $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Для подальшого пересіву культури *T. viride* середовище стерилізованого КДА розливають в стерилізовані пробірки по 10 мл у кожену. Потім пробірки стерилізували в автоклаві при температурі 121°C протягом 20 хвилин. Після автоклавування пробірку потрібно нахилити під кутом 45° , для збільшення площі поверхні середовища в пробірці. Міцелій 7-денних культур зішкрібають за допомогою скребка над полум'ям та переносять на скошені пробірки. Після пересіву пробірки тримають в термостаті при температурі $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Для приготування поживного середовища рН доводять до 6 за допомогою 1% НСІ. Потім середовище стерилізують в автоклаві при 121°C температурі протягом 20 хвилин. Модифікований КДА готується, використовуючи 125 г картоплі та 15 г декстрази замість 200 г картоплі та 20 г декстрази відповідно порівнюючи із звичайним КДА. рН середовища доводять до 6 за допомогою рН -метра за допомогою 1% НСІ та проводиться автоклавування відповідно [59]. Оптимальним діапазоном рН для культур триходерми є 5,5-7. Діапазон температур, при яких триходерми зберігають свою здатність відтворення $20-40^\circ\text{C}$, найкращими є умови при $25-30^\circ\text{C}$. Аерацію слід підтримувати до 150 об/хв, а при перебільшенні обертів понад 200 об/хв продуктивність культури значно зменшується [60].

Для культивування в рідкій культурі зазвичай використовуються такі поживні середовища: бульйон картопляної декстрази, овочевий сік, м'ясо-дріжджові середовища та пшеничні висівки. У більшості випадків гриби проявляють патогенність на стадії спор, для формування яких необхідні певні умови, які можна забезпечити за поверхневого культивування. Проте, як засвідчує практика, поверхневий спосіб вирощування грибів малопродуктивний та енергозатратний при виробництві. Тому культивування в рідкому середовищі глибинним методом порівняно з іншими варіантами є

найбільш вигідним та ефективним, щоб отримати гриб з найвищою антагоністичною активністю.

Триходерму отриману поверхневим способом культивування використовують в основному для прямого внесення в ґрунт. Біомасу від рідкого бродіння можна перетворити у різні стани такі, як гранули, пелети, порошки. Також можна наносити на насіння шляхом біозатравки для контролю кількох ґрунтових хвороб деяких польових культур.

Наприклад, саджанці садових культур і рису обробляють занурюванням коренів у суспензію триходерми перед посадкою. Гранульовані препарати використовувалися для безпосереднього внесення в ґрунт[57].

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт дослідження

Роботу виконано на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ імені Олеся Гончара. Об'єктом дослідження було вдосконалення технології виробництва біопрепарату для захисту рослин на основі грибів роду *Trichoderma*.

Як тест-культури мікроміцетів використовували штами роду *Trichoderma*: *T. viride* КМВ-F-15, *T. lignorum* КМВ-F-14, *T. viride* КМВ-F-18 отримані із колекції культур мікроорганізмів кафедри.

У якості тест-культур використовували штами фітопатогенних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* ІМВ 8982, *Agrobacterium tumefaciens* ІМВ 8628, *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* ІМВ 7595, взяті із колекції культур мікроорганізмів кафедри.

Також у якості тест-культур використовували штами фітопатогенних грибів: *Fusarium culmorum* ІМВ-F- 50716, *Alternaria alternata* КМВ-F-16,

Aspergillus niger КМВ-F- 25, *Fusarium oxysporum* КМВ-F-12 отримані із колекції культур мікроорганізмів кафедри та *Fusarium oxysporum* ІМВ-F- 54201 із колекції культур мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного.

Для перевірки фітотоксичної дії мікроміцетів-антагоністів *Trichoderma viride* КМВ-F-15 використовували насіння ячменя ярого сорту «Шедевр».

2.2 Поживні середовища

Для культивування та зберігання штамів *Trichoderma viride* КМВ-F-15, *Trichoderma lignorum* КМВ-F-14, *Trichoderma viride* КМВ-F-18 використовували середовище Чапека (г/л дистильованої води): сахароза – 30,0; NaNO₃ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,5; KCl – 0,5; FeSO₄ – 0,01; агар-агар – 20,0. Культивування проводили 7 діб за температури 29°C.

Для культивування *Trichoderma viride* КМВ-F-15 у глибинних умовах використовували 3 поживних середовища: середовище №1 складу (г/л): гліцерин – 35, K₂HPO₄ – 0,99, (NH₄)₂SO₄ – 3, MgSO₄*7H₂O – 0,5, KCl – 0,5, FeSO₄*7H₂O – 0,01; середовище №2 (г/л): кукурудзяний екстракт – 25, патока- 20, K₂HPO₄ -1, KCl – 0,5, FeSO₄*7H₂O – 0,01, MgSO₄*7H₂O – 0,5; середовище №3 (г/л): дріжджовий автолізат – 3, сахароза – 20.

Для культивування та зберігання фітопатогенних бактерій використовували поживне середовище МПА і картопляний агар наступного складу (г/л водопровідної води): відвар картоплі – 300,0; агар-агар – 20,0 [46]. Культивування проводили 24 год за температури 29°C. Чистоту культури перевіряли мікроскопуванням.

Для культивування та зберігання фітопатогенних грибів використовували картопляний агар з глюкозою наступного складу (г/л водопровідної води): відвар картоплі – 300,0; глюкоза – 10,0; агар-агар – 20,0 [46]. Культивування проводили 3-5 діб за температури 29°C, рН 5,5-7.

2.3 Методи визначення антагоністичної активності грибів роду *Trichoderma* визначення фітотоксичності триходерми

Оцінювали антагоністичний потенціал *T. viride* КМВ-F-15, *T. lignorum* КМВ-F-14, *T. viride* КМВ-F-18 методом бінарної культури [63] проти фітопатогенних грибів *Fusariumculmorum* ІМВ-F-50716, *Alternariaalternata* КМВ-F-16, *Aspergillusniger* КМВ-F-25, *Fusariumoxysporum* ІМВ-F-54201, *Fusariumoxysporum* КМВ-F-12. Диски міцелію (діаметром 7 мм) з активно зростаючими 6-денними культурами патогенів та власне грибів роду *Trichoderma* поміщали в чашки Петрі на середовище Чапека на рівній відстані від периферії. Контрольні чашки засівали тільки патогенним грибом. Чашки Петрі інкубували при $28 \pm 0,2$ °С протягом шести днів.

Антагоністичну здатність ізолятів вимірювали у відсотках інгібування (PI %) на основі рівняння $PI \% = [(S1 - S2) / S1] \times 100$,

де S1 – контрольна зона колонії з патогеном;

і S2 – область колонії патогена у присутності мікроміцету.

Антагоністичну активність мікроміцета по відношенню до різних видів фітопатогенних бактерій (*Pectobacteriumcarotovorum* ІМВ 8982, *Agrobacteriumtumefaciens* ІМВ 8628, *Pseudomonassyringa* epv. *Lachrymans* ІМВ 7595) визначали методом агарових блоків [63]. Для постановки досліду *T. viride* засівали на поверхню середовища Чапека. Чашки інкубували у термостаті 6 діб за температури 29°C. Стерильними пробірками із внутрішнім діаметром 8 мм вирізали блоки із середовища, засіяного мікроміцетом. У чашки із МПА висівали суспензії фітопатогенних бактерій і розтирали шпателем Дригальського. Далі на ці чашки ставили по 4 блоки із мікроміцетом.

Чашки залишили на 18-20 год у холодному місці для дифузії речовин. Після цього інкубували чашки у термостаті 24 год за температури 29°C. Антагоністичну активність визначали за діаметром зон пригнічення росту фітопатогенних бактерій.

Досліджували фітотоксичну дію *T. viride*КМВ-F-15 на проростках ярого ячменю (сорт «Шедевр») [64]. Відповідно насіння ячменю (100 насінин для кожного варіанту досліду) замочували в культуральній рідині (розведення 1:10), дистильованій воді та середовищі культивування гриба *T. viride* протягом 2 годин. Після чого насіння розкладали на вологий фільтрувальний папір в чашках Петрі та регулярно зволожували водою. Кількість пророщеного насіння та довжину коренів і пагонів проростків ячменю визначали на четверту добу після обробки. Контрольними зразками служили насіння ячменю, замочене в дистильованій воді та у середовищі культивування гриба.

Визначали (у %) вплив обробки насіння культуральною рідиною триходерми на ростові показники паростків порівняно з контролями. Порівнювали енергію проростання зерен, що були замочені розчином культуральної рідини досліджуваного штаму порівняно з контролями.

2.4 Метод дослідження утворення конідій *Trichoderma viride*КМВ-F-15 за двоетапної технології отримання біопрепарату

Культивування *T. viride*КМВ-F-15 проводилося у глибинних умовах на трьох різних середовищах за температури 28 С⁰ протягом 3 діб на мікробіологічній качалці (200 об/хв). Отриману біомасу фільтрували через три шари марлі до отримання густої біомаси з вологістю приблизно 88%. Отриману біомасу рівномірно розподіляли на два зразки, в один з яких додавали 10 % розчин оцтової кислоти до створення рН 4,0. Зразки зберігали при 25 ± 1 °С і вологості в межах 55–65 %. Щотижня частину кожного зразка

рівномірно поливали 4 мл стерильної дистильованої води. Життєздатність протигрибкову активність *T. viride* КМВ-F-15 визначали через 2 та 4 тижні.

Фунгістатичний потенціал *T. viride* визначали одночасно з життєздатністю, вивчаючи колонізацію поверхні агаризованого середовища та її конкурентоспроможність із патогенним для рослин грибом *Fusarium culmorum* ІМВ-F-50716. Стерилізовані в автоклаві диски фільтрувального паперу діаметром 0,4 см рівномірно змочували 1% суспензією *T. viride* КМВ-F-15, отриманою шляхом змішування 0,1 г біомаси *T. viride* з 10 мл стерильної води. Ці диски поміщали на картопляний агар на відстані 4 см від диску агару з *F. culmorum* діаметром 0,4 см, вирізаної з попередньо підготовленої чашки

Петрі семиденною культурою. Чашки Петрі з обома культурами інкубували 7 днів при температурі 25 ± 1 °С. Життєздатність вимірювали на третій день за площею колонізованої поверхні *T. viride* КМВ-F-15 і виражали у відсотках від загальної площі поверхні пластини. Фунгістатичну активність визначали на сьомий день площі колонізованої поверхні *F. culmorum* ІМВ-F-50716 [65].

2.5 Метод зберігання торф'яного препарату

До 0,5 кг торфу додають 75 мл *T. viride* КМВ-F-15, отриманого в процесі глибинного культивування в колбах (з 3 різних поживних середовищ), 270 мл води та 15 мл 7-ми добової *T. viride* КМВ-F-15, вирощеної в стаціонарних умовах на картопляно-глюкозному рідкому середовищі, отримуючи приблизно 0,7-0,8 кг торф'яного препарату [66]. Кожен такий торф'яний препарат поміщали у зіп-пакет з отворами для аерації та зберігали у термостаті при 30 ± 3 °С протягом 8 тижнів. Кількість колонієутворюючих одиниць в 1 г препарату визначали на перший день внесення, 2 та 8 тижнів зберігання.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що гриби роду *Trichoderma* вважаються потенційними агентами в боротьбі з грибковими та бактеріальними захворюваннями рослин. За даними Руша та інших [67], мікроміцети *Trichoderma* представляють 50-60% агентів біологічного контролю. Вони можуть безпосередньо взаємодіяти з корінням, збільшуючи ріст рослин, стійкість до хвороб і абіотичного стресу. Крім того, *Trichoderma* може безпосередньо пригнічувати патогени рослин за допомогою антибіозу внаслідок виділення вторинних метаболітів, а також за допомогою механізмів мікопаразитування.

У зв'язку з цим, скринінг антагоністів бактеріальних і грибних фітопатогенів серед мікроміцетів цієї групи становить великий інтерес для подальшого створення біопрепаратів захисту рослин.

3.1. Антагоністична активність трьох штамів *Trichoderma* відносно різних фітопатогенів та перевірка відсутності фітотоксичності обраного штаму

Найбільш небезпечну групу збудників хвороб рослин представляють фітопатогенні гриби. Останнім часом зросла кількість загинув рослин від раптового спалаху сірої гнилі, вертицильозу, антракнозу, фітофторозу, що призводить до значних втрат врожаю. Гриби роду *Trichoderma* проявляють протигрибкову дію відносно *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae* та *Botrytis cinerea*, завдяки найбільшій кількості ізольованих біологічно активних сполук, в якій можуть бути задіяні різні групи вторинних метаболітів, такі як терпени, пірони, гліотоксин, гліовірин і пептайболи [17].

Тому було вирішено перевірити фунгістатичну активність *T. viride* КМВ-F-15, *T. lignorum* КМВ-F-14, *T. viride* КМВ-F-18 на агаризованому середовищі методом бінарної культури відносно фітопатогенних грибів,

таких як *Fusariumculmorum*ІМВ-Ф- 50716, *Alternariaalternata*КМВ-Ф-16, *Aspergillusniger*КМВ-Ф- 25,*Fusariumoxysporum*ІМВ-Ф- 54201 та*Fusariumoxysporum*КМВ-Ф-12.

Як видно з даних, наведених у таблиці3.1, найбільшу фунгістатичну активність показала *T. viride*КМВ-Ф-15 проти досліджуваних патогенних грибів(рис.3.1).

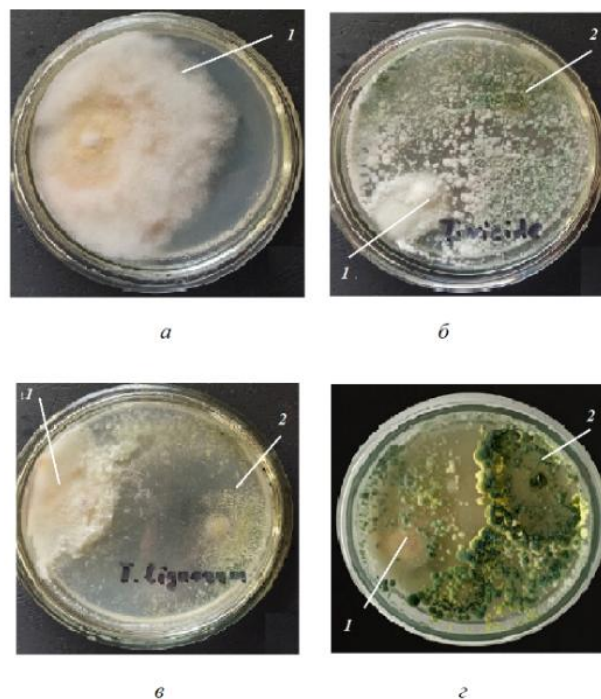


Рис. 3.1. Фунгістатична дія грибів роду *Trichoderma* відносно фітопатогена *F. culmorum*ІМВ-Ф-50716: а – контроль (монокультура фітопатогена); б – *T. viride* КМВ-Ф-18 проти фітопатогена; в – *T. lignorum* КМВ-Ф-14 проти фітопатогена; г – *T. viride* КМВ-Ф-15 проти фітопатогена; 1 – *F. culmorum*ІМВ-Ф-50716; 2 – гриб-антагоніст

Найвищий показник інгібування росту (у%) *T. viride*КМВ-Ф-15 виявився відносно *F. culmorum*ІМВ-Ф-50716і сягнув $94,42\pm 0,04$ від контролю, а найменший показник інгібування спостерігався проти*F. oxysporum* КМВ-Ф-12. Фунгістатичний потенціал *T. viride*КМВ-Ф-18порівняно з *T. viride*КМВ-Ф-15 був нищий, окрім *A.niger*КМВ-Ф-25.

Таблиця 3.1

Фунгістатична активність штамів *T. viride* KMB-F-15, *T. lignorum* KMB-F-14, *T. viride* KMB-F-18 у бінарній культурі

Фітопатогенні гриби	<i>T. viride</i> KMB-F-15	<i>T. viride</i> KMB-F-18	<i>T. lignorum</i> KMB-F-14
	% інгібування росту відносно контролю	% інгібування росту відносно контролю	% інгібування росту відносно контролю
<i>F. culmorum</i> IMB-F- 50716	94,42± 0,04	86,71±0,05	71,9±0,04
<i>A. alternata</i> KMB-F-16	92,53 ±0,02	80,72±0,04	75,34±0,02
<i>A. niger</i> KMB-F- 25	60,43± 0,05	65,7±0,06	33,91±0,01
<i>F. oxysporum</i> IMB-F- 54201	65,65± 0,03	50,51±0,02	43,98±0,04
<i>F. oxysporum</i> KMB-F-12	46,1± 0,02	40,3±0,04	32,82±0,05

Стосовно *T. lignorum* КМВ-F-14 показники фунгістатичної активності були найнижчі, порівнюючи із двома іншими штамми триходерми.

Із різних джерел стверджується, що окрім фунгістатичної активності, триходерма може інгібувати ряд фітопатогених бактерій [21]. Так як, результати визначення антифунгального потенціалу мікроміцетів *Trichoderma* в бінарній культурі на середовищі Чапека показали, що найактивніший з них штам – *T. viride* КМВ-F-15, то саме він у подальшому досліджується на антагоністичні властивості.

Фітопатогенні бактерії найчастіше зустрічаються серед представників родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium* [3]. Вони викликають різні гnilі, опіки, плямистості, в'янення, пухлинні розростання. Біоактивні сполуки, які виділяє *T. viride* пошкоджують бактеріальні клітини за різними механізмами (інгібують важливі ферменти, інтеркалюють ДНК, руйнують клітину стінку та ін.) тим самим інгібуючи їх ріст, тобто призводить до загибелі бактеріальної клітини [21].

У зв'язку з цим, штам *T. viride* КМВ-F-15 досліджено на наявність антагоністичних властивостей методом агарових блоків відносно наступних бактеріальних фітопатогенів: *Pectobacterium carotovorum* ІМВ 8982, *Agrobacterium tumefaciens* ІМВ 8628, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ІМВ 7595. Результати визначались за зоною затримки росту тест-культур.

Найвищу активність мікроміцет-антагоніст показав проти *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ІМВ 7595 і діаметр зони пригнічення росту становив у середньому 15,5 мм. Стосовно *Pectobacterium carotovorum* ІМВ 8982 та *Agrobacterium tumefaciens* ІМВ 8628, то діаметри зон пригнічення росту менші, порівняно з *P. syringae* pv. *lachrymans*, і становили 14,75 мм та 12 мм відповідно (рис.3.2).

З літературних джерел відомо, що деякі представники роду *Trichoderma* – активні штами-антагоністи – здатні пригнічувати проростання насіння. Токсичними вважають культури, що викликають зниження схожості насіння або пригнічення зростання проростків і коренів не менше ніж на 30% у порівнянні з контролем [35]. Тому перспективний для створення біопрепарату штам *T. viride* КМВ-F-15 було перевірено на відсутність фітотоксичності.

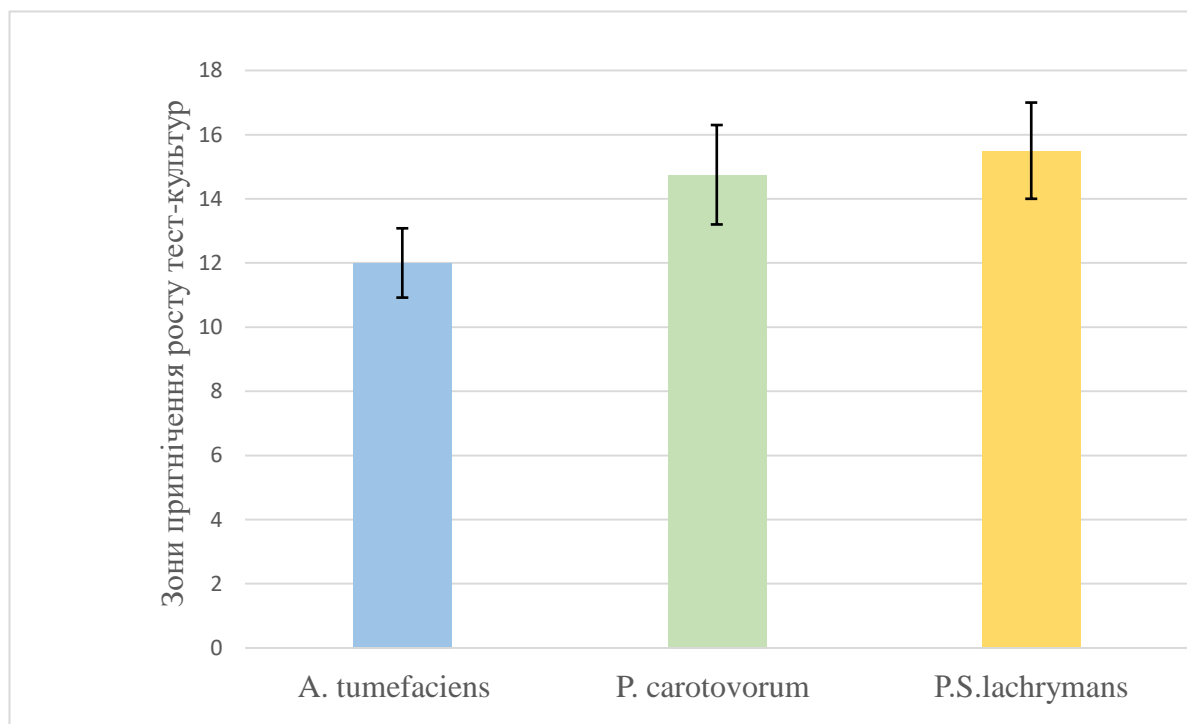


Рис.3.2 Антагоністична активність *T. viride* КМВ-F-15 відносно фітопатогених бактерій

Встановлено, що культуральна рідина триходерми (розведення 1:10) не пригнічувала розвиток проростків ячменя ярого сорту «Шедевр». (табл. 3.2., рис.3.3).Різниці в довжині пагонів та коренів проростків при обробці насіння

культуральною рідиною *T.viride* КМВ-F-15 та контрольними обробками не достовірні ($P>0,05$), тому фітотоксичності не виявлено.

Таблиця 3.2

Вплив культуральної рідини *T.viride* КМВ-F-15 на формування проростків ярого ячменю сорту «Шедевр»(n=100)

Варіант обробки	Енергія проростання, %	Середня довжина коренів, мм	% від контролю 1	% від контролю 2	Довжина пагонів, мм	% від контролю 1	% від контролю 2
Культуральна рідина	94 ±1,09	166,22± 4,4	107,7	105,5	25,5 ± 1,84	91,2	82,8
Контроль 1	89±0,83	154,38± 19,83	100	-	27,96 ± 3,64	100	-
Контроль 2	95 ±1,41	157,58 ±9,86	-	100	30,78 ± 1,67	-	100

Примітка: контроль 1 – обробка насіння водою, контроль 2 – середовищем для росту гриба



Рис. 3.3. Вплив культуральної рідини *T.viride* КМВ-F-15 на формування проростків ярого ячменю сорту «Шедевр»

Таким чином, штам *Trichoderma viride* КМВ-F-15, який проявляє антагоністичну активність відносно фітопатогенних грибів та бактерій, характеризується тим, що не несе фітотоксичного впливу на проростання насіння ярого ячменя сорту «Шедевр».

3.2. Дослідження утворення конідій *Trichoderma viride* КМВ-F-15 за двоетапної технології отримання біопрепарату

Гриби роду *Trichoderma* здатні розмножуватися безстатевим шляхом, утворюючи міцелій, хламідоспори та конідії. У глибинних умовах, зазвичай продукуються хламідоспори, тоді як при поверхневому культивуванні – конідії. Вважається, що конідії характеризуються довшим терміном виживання, ніж хламідоспори, а за рівнем пригнічення збудників кореневих гнилей вони майже однакові. Повідомлялось також, що деякі вторинні метаболіти, що мають антимікробну активність, такі як пептайболи, полікетиди, терпени, продукуються під час утворення конідій. Тому більшість комерційних препаратів містять конідії. Проте глибинне культивування, порівняно з поверхневим, характеризується меншою трудомісткістю та більш контрольоване. Все це слугує основою застосування двоетапної технології отримання препаратів на основі триходерми: на першому етапі в глибинних умовах отримують міцелій, а на другому етапі після згущення біомаси створюють умови для утворення конідій. Оскільки за даними літератури, для деяких представників роду *Trichoderma* кисле значення рН має вирішальне значення для дозрівання конідій, нами було

досліджено вплив оцтової кислоти на зберігання життєздатності біомаси досліджуваної культури гриба [68].

Нами було досліджено конідієутворення, життєздатність та фунгістатичну активність густої біомаси *Trichoderma viride* КМВ-F-15, отриманої в глибинних умовах у різних поживних середовищах, під час її зберігання. Біомасу гриба отримували, використовуючи 3 різних середовища: оптимізоване для росту гриба середовище на основі гліцерину та мінеральних солей (середовище №1), середовище на основі зеленої патоки та кукурудзяного екстракту (середовище №2) та середовище з дріжджовим екстрактом та сахарозою (середовище №3).

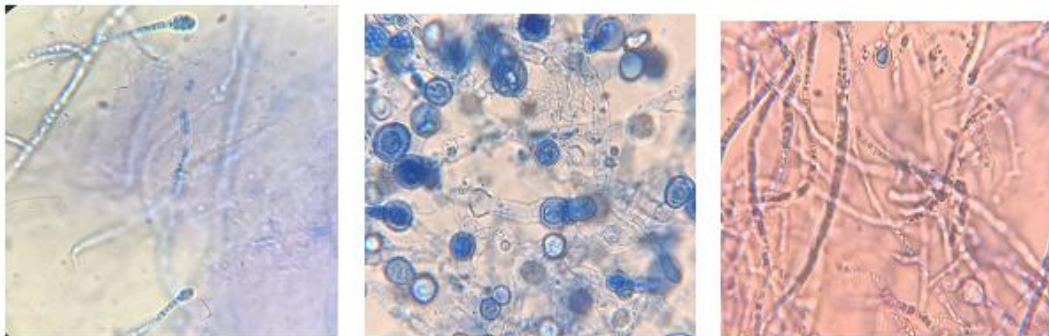
Після глибинного культивування з 300 мл поживного середовища було отримано: 5,8 г вологої біомаси (вихід – 19,3 г/л) з вологістю 84 % у середовищі №1; 10,6 г вологої біомаси (35,3 г/л) з вологістю 93 % – у середовищі №2; 6,5 г вологої біомаси (21,7 г/л) з вологістю 93 % – у середовищі №3. Отриману густу біомасу гриба зберігали в чашках за температури 25 °С упродовж 4 тижнів. Кожний зразок біомаси було поділено на дві частини: в одну частину додавали 10 % розчин оцтової кислоти (до рН4), в іншу – нічого не додавали. Зовнішній вид біомаси був білого (зразки №1 та №3) або бежевого (зразок №2) кольору.

На початку закладання густої біомаси на дозрівання досліджували морфологію гриба за допомоги світлової мікроскопії, використовуючи препарат «роздавлена крапля». Біомаса, отримана на середовищі №1 та №3 була представлена міцелієм з невеликою кількістю хламідоспор, біомаса з середовища №2 містила велику кількість хламідоспор (рис.3.4).

Через 3 доби після витримки в термостаті при температурі 25 °С на поверхні біомаси, отриманої у середовищі №3 без обробки оцтовою кислотою, утворилися зелені конідії. На 9 добу почали формуватися конідії

на поверхні біомаси, отриманої на середовищі №1. У всіх інших варіантах, у тому числі з додавання оцтової кислоти, конідії не утворювалися (рис 3.5).

На 2 та 4 тижні витримки зразків біомаси в термостаті проведено визначення життєздатності гриба шляхом накладання на поверхню чашки з картопляно-глюкозним агаром паперового диску, просякненого 1 % суспензією біомаси гриба.



а

б

в

Рис. 3.4 Морфологія *T. viride* KMB-F-15 при вирощуванні в глибинних умовах упродовж 3 діб у різних середовищах: а – середовище №1; б – середовище №2; в – середовище №3.

Паралельно визначали фунгістатичну активність гриба, розташовуючи на поверхні середовища блок, вирізаний з газону культури фітопатогена *F. culmorum* ІМВ-F-50716 (бінарні культури).

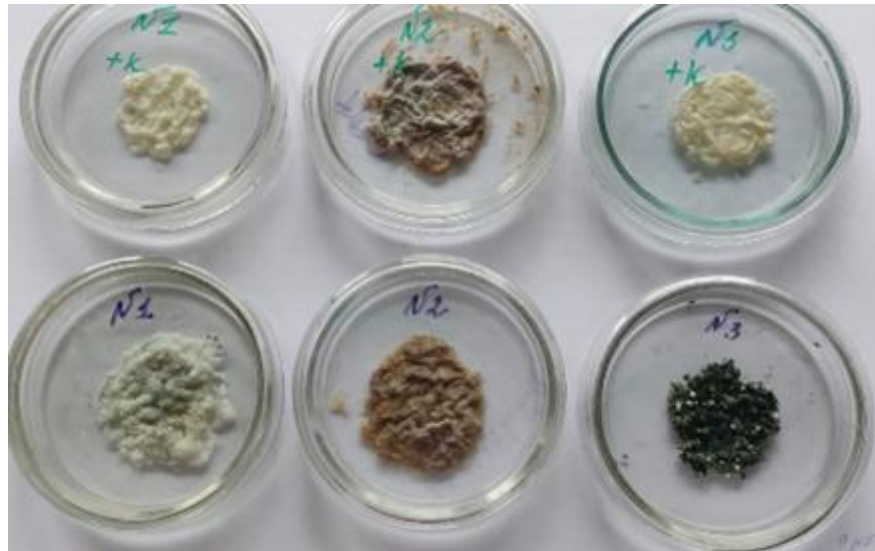


Рис. 3.5 Зовнішній вигляд зразків біомаси на 9 добу витримки в термостаті за 25 °С. Позначки: №1, №2, №3 – зразки біомаси; +К – додавання оцтової кислоти до зразка біомаси

Життєздатність гриба визначали за відсотком колонізації поверхні поживного середовища на 3 добу росту; фунгістатичну активність – за відсотком інгибування росту фітопатогена на 7 добу росту.

На 2 та 4 тижні витримки зразків біомаси в термостаті проведено визначення життєздатності гриба шляхом накладання на поверхню чашки з картопляно-глюкозним агаром паперового диску, просякненого 1 % суспензією біомаси гриба. Паралельно визначали фунгістатичну активність гриба, розташовуючи на поверхні середовища блок, вирізаний з газону культури фітопатогена *F. culmorum* ІМВ-*F*-50716 (бінарні культури). Життєздатність гриба визначали за відсотком колонізації поверхні поживного середовища на 3 добу росту; фунгістатичну активність – за відсотком інгибування росту фітопатогена на 7 добу росту.

Як видно з даних табл. 3.2 та рис. 3.6, найбільше значення колонізації поживного середовища після двотижневої витримки за 25 °С виявлено для зразка біомаси гриба, вирощеного в середовищі №3 (84,0 %).

Таблиця 3.3

Життєздатність біомаси *Trichoderma viride* КМВ-F-15 на різні терміни витримки

Зразок біомаси	Колонізація поверхні середовища, % на	
	2 тиждень	4 тиждень
№1	76,2 ± 1,5 ^{ab}	63,9 ± 1,9 ^{ab}
№1+К	0	Н. в.
№2	66,9 ± 2,5 ^a	45,73 ± 7,2 ^a
№2+К	50,9 ± 0,8 ^a	38,2 ± 3,4 ^a
№3	84,0 ± 1,7 ^b	83,79 ± 9,5 ^b
№3+К	0	Н. в.

Примітки: Н. в. – не визначали; +К – додавання оцтової кислоти; різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, $P < 0,05$).

Трохи нижчі значення були для зразка біомаси, отриманої з середовища №1 (76,2 %), але ця різниця була не достовірною, по відношенню до зразка №3 ($P > 0,05$).

Зразок біомаси, який було отримано від середовища №2 показав 66,9 % колонізації поверхні середовища, що достовірно відрізнялося від життєздатності зразка №3 ($P < 0,05$). Виявлено повне гальмування росту гриба при зберіганні в присутності оцтової кислоти в зразках біомаси, вирощеної у середовищах №1 та №3. Біомаса, отримана від середовища №2, показала в присутності оцтової кислоти нижчу життєздатність, порівняно з відповідним зразком без додавання кислоти, проте ця різниця була не достовірною ($P > 0,05$).

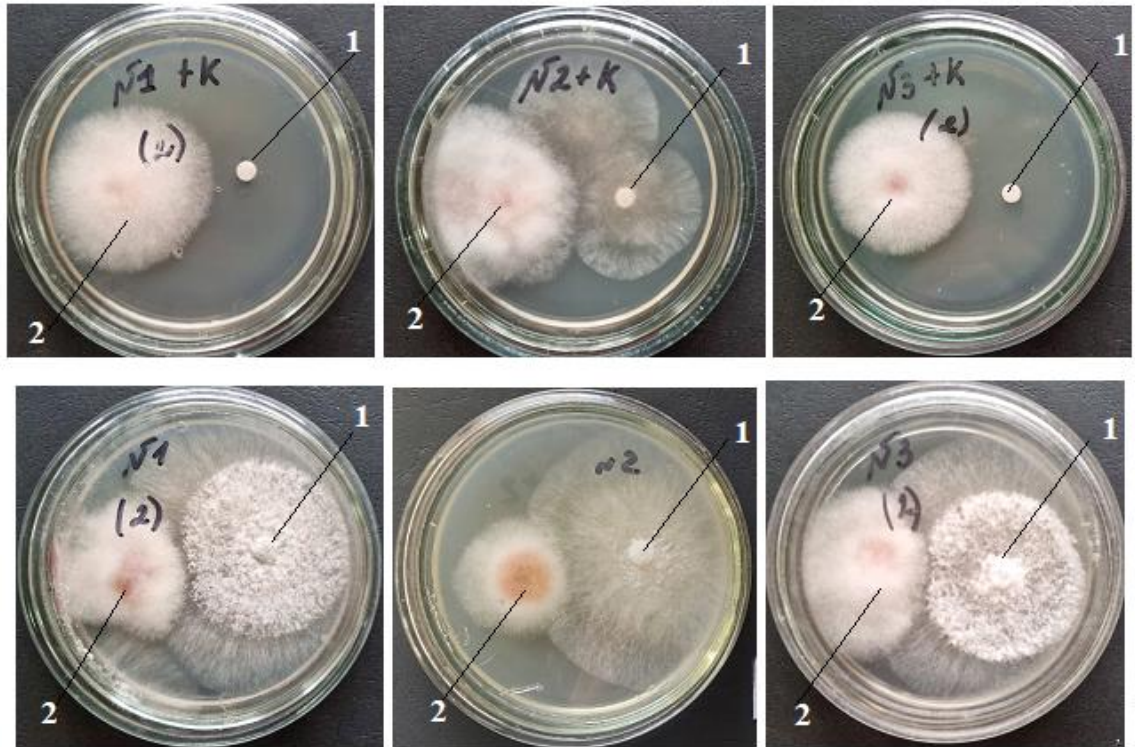


Рис. 3.6 Життєздатність біомаси *T. viride* КМВ-F-15 на 2 тиждень витримки за 25 °С у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716: 1 – паперовий диск, просочений суспензією *T. viride*; 2 – агаровий блок *F. culmorum*; №1, №2, №3 – зразки біомаси; +К – додавання оцтової кислоти

Через 2 тижні витримки біомаси в термостаті проведено мікроскопування зразків з метою виявлення утворених конідій (рис. 3.7). Зразок біомаси №3 містив велику кількість конідій, тоді як зразок №2 та №2 з додаванням оцтової кислоти містив лише хламідоспори. Саме в кінці культивування в середовищі №2 на початку експерименту було виявлено велику кількість хламідоспор (див. рис.3.4). Зразок біомаси №1 містив як конідії, так і хламідоспори.

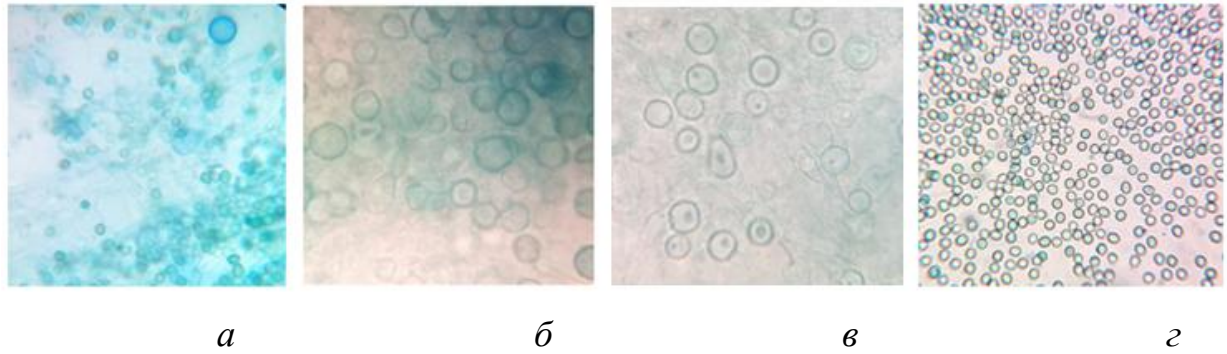


Рис. 3.7 Морфологія *T. viride* КМВ-F-15 у зразках біомаси після 2 тижнів витримки за 25 °С: *а* – зразок біомаси №1; *б* – №2; *в* – №2 з оцтовою кислотою; *г* – №3

Після 4 тижнів витримки зразків біомаси за 25 °С тільки зразок №3 зберігав життєздатність на рівні попереднього значення, всі інші зразки мали знижені показники колонізації поверхні середовища (див. табл. 1, рис. 3.8).

Визначення фунгістатичної активності 1 % суспензії зразків біомаси триходерми відносно *F. culmorum* ІМВ-F-50716 проводилося у бінарній культурі на 7 добу інкубування (табл.3.4, рис. 3.9,3.10). На цей час *T. viride* КМВ-F-15 повністю колонізував поверхню середовища, окрім тієї, що займав *F. culmorum*. Інгібування росту фітопатогена визначали порівняно з контролем (його ростом у відсутності триходерми).

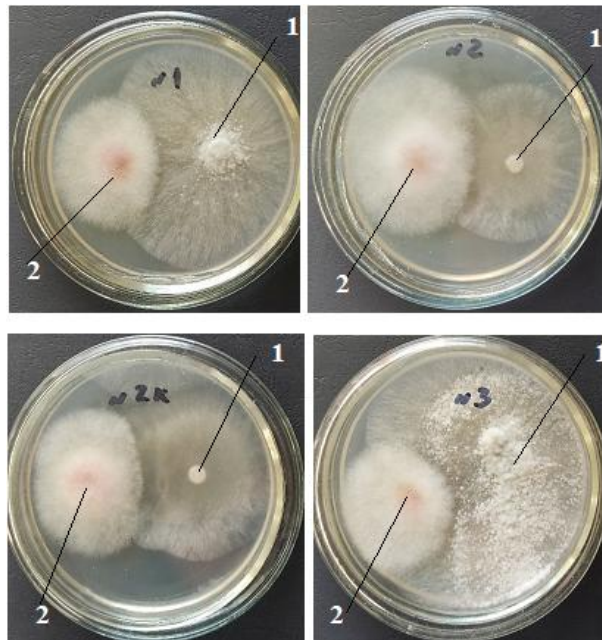


Рис. 3.8 Перевірка життєздатності біомаси *T. viride* КМВ-F-15 на 4 тиждень витримки за 25 °С у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716. Позначки: 1 – паперовий диск, просочений суспензією *T. viride* КМВ-F-15; 2 – агаровий блок *F. culmorum* ІМВ-F-50716; №1, №2, №3 – зразки біомаси триходерми; К – додавання оцтової кислоти до зразка біомаси

Таблиця 3.4

Фунгістатична активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15 по відношенню до *F. culmorum* ІМВ-F-50716 на різні терміни витримки

Зразок біомаси	Фунгістатична активність, % інгібування на	
	2 тиждень	4 тиждень
№1	84,0 ± 2,1 ^b	70,2 ± 1,4 ^{ab}
№1+К	0	Н. в.
№2	51,5 ± 1,8 ^a	64,5 ± 7,1 ^{ab}
№2+К	61,4 ± 2,6 ^a	63,8 ± 5,6 ^a
№3	72,8 ± 3,5 ^b	85,2 ± 3,7 ^b
№3+К	0	Н. в.

Примітки: Н. в. – не визначали; +К – додавання оцтової кислоти; різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, $P < 0,05$).

Встановлено, що високі відсотки інгібування росту фітопатогена спостерігався для зразків біомаси №1 (84 %) та №3 (84 %) на 2 тиждень витримки в термостаті, проте на 4 тиждень відбулось зниження фунгістатичної активності зразка №1 (70,2 %).

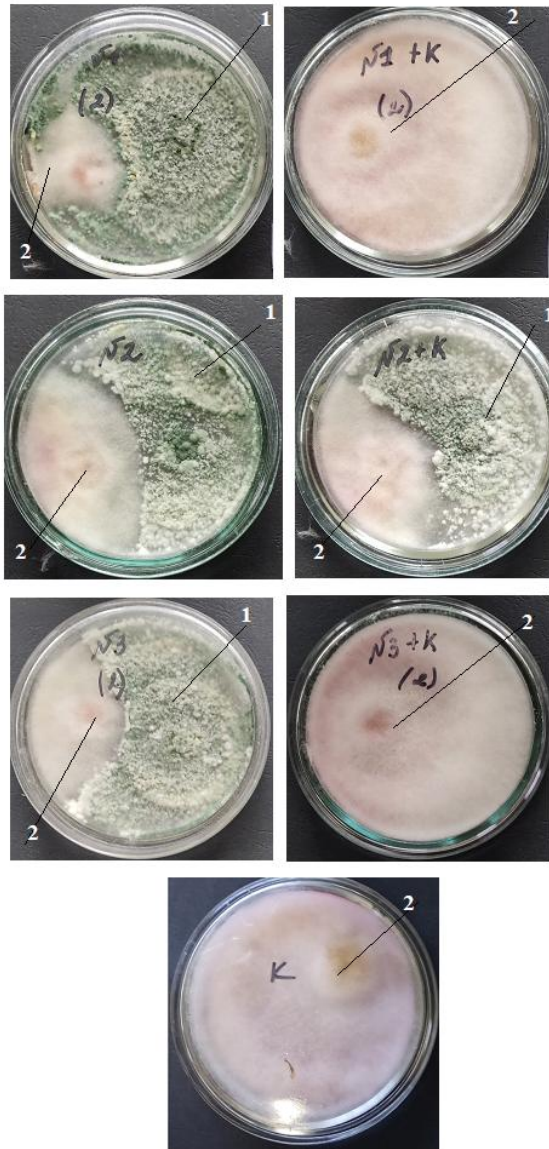


Рис. 3.9 Фунгістатична активність біомаси *T. viride* КМВ-F-15 (на 2 тиждень витримки за 25 °С) у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716: 1 – *T. viride* КМВ-F-15; 2 – *F. culmorum* ІМВ-F-50716; №1, №2, №3 – зразки біомаси триходерми; +К – додавання оцтової кислоти до зразка біомаси; К – контроль

Навпаки, фунгістатична активність зразка №3 на 4 тиждень збільшилась, порівняно з 2 тижнем (85,2 % проти 72,8 %). Що стосується зразка №2 та зразка №2 з оцтовою кислотою, то їх фунгістатична активність була нижчою, ніж зразків №1 та №3, хоча зниження активності на 4 тиждень (порівняно з попереднім визначенням) не відмічалось.

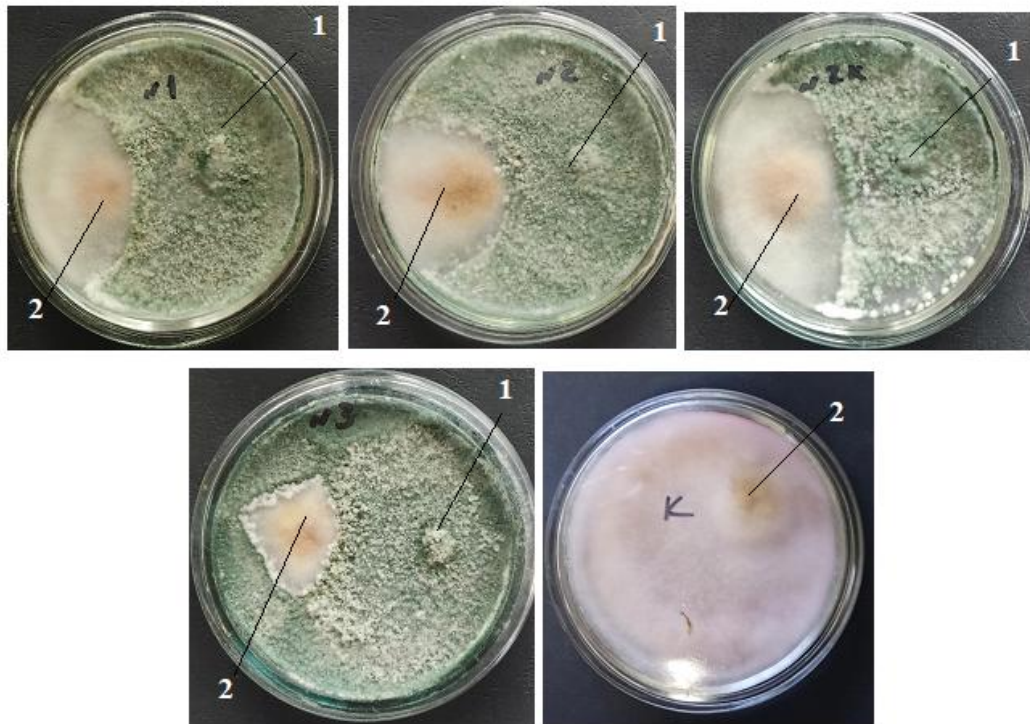


Рис. 3.10 Фунгістатична активність біомаси *T. viride* КМВ-F-15 (на 4 тиждень витримки за 25 °С) у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716: 1 – *T. viride* КМВ-F-15; 2 – *F. culmorum* ІМВ-F-50716; №1, №2, №3 – зразки біомаси триходерми; №2К – зразок №2 з додавання оцтової кислоти; К – контроль

Підсумовуючи отримані дані, слід відмітити, що додавання оцтової кислоти згубно подіяло на міцелій *T. viride* КМВ-F-15, тоді як хламідоспори були менш чутливими до дії кислоти. Такий висновок можна зробити на основі факту, що зразок біомаси, який був отриманий після культивування в середовищі №2 і складався з великої кількості хламідоспор, зберігав

життєздатність та фунгістатичну активність упродовж всього терміну спостереження, тоді як зразки №1 та №3, які містили гіфи та невелику кількість хламідоспор після додавання кислоти втрачали життєздатність.

З даних літератури відомо, що деякі представники роду *Trichoderma* здатні до росту та спороутворення від рН 2 до рН 8 [69]. Штам *T. asperellum* MSCL 309 показав високу здатність до колонізації поверхні поживного середовища після обробки біомаси соляною кислотою (до рН 4), відповідно протигрибкова активність цього штаму також була вищою, ніж за інших досліджених варіантів обробки біомаси. За думкою авторів цієї публікації низьке значення рН є вирішальним фактором для рясного утворення конідій *T. asperellum* MSCL 309 [65]. Додавання соляної кислоти наприкінці глибинного культивування цього штаму було ефективним під час зберігання торф'яного препарату на його основі, що пояснювалося авторами не тільки стимулюванням утворення конідій, а й зниженням метаболічної активності гриба [65,66]. В наших дослідженнях використовувалося додавання до біомаси не соляної кислоти, а оцтової, хоча й до досягнення рН 4. Розбіжності щодо отриманих нами даних і згаданих публікацій можуть бути пояснені як застосуванням різних кислот, так і біологічними особливостями досліджуваних штамів триходерми.

Треба відмітити вирішальний вплив складу поживного середовища для накопичення біомаси *T. viride* КМВ-F-15 в глибинних умовах на процеси утворення конідій, життєздатності та фунгістатичної активності на другому етапі (дозрівання біомаси в стаціонарних умовах) цієї двоетапної технології виробництва препарату. Із трьох випробуваних поживних середовищ для отримання якісного препарату треба обрати середовище №3, що містить сахарозу та дріжджовий екстракт. Біомаса, отримана з цього середовища, утворює велику кількість конідій упродовж 10 діб витримки за температури 25°C та характеризується високою життєздатністю та фунгістатичною активністю. Після утворення конідій біомасу можна висушити, подрібнити та

стандартизувати, додаючи наповнювач, а також інші добавки, що сприяють зберіганню життєздатності конідій (тальк, деревне вугілля, карбоксиметилцелюлозу тощо) [66, 69].

3.3. Зберігання торф'яного препарату *Trichoderma viride* КМВ-F-15

Біомасу *Trichoderma* spp., отриману глибинним вирощуванням гриба, можна вносити у різні носії, такі як компостований гній, жом, біовугілля, гранули деревини, тальк та торф. Часто як носій для біопрепаратів на основі триходерми використовують торф, який широко застосовують як субстрат для вирощування рослин [66]. Тому на наступному етапі даної роботи було досліджено зберігання життєздатності і фунгістатичної активності *T. viride* КМВ-F-15 у різних зразках торф'яного препарату в залежності від складу поживного середовища, в якому було отримано біомасу гриба.

Для глибинного культивування гриба використовувалися ті самі середовища, що й для досліджень конідієутворення на поверхні біомаси: середовище на основі гліцерину та мінеральних солей (отримували зразок торф'яного препарату №1), середовище на основі зеленої патоки та кукурудзяного екстракту (зразок торф'яного препарату №2) та середовище з дріжджовим екстрактом та сахарозою (зразок торф'яного препарату №3). Для формування препарату застосовували схему, описану в статті А. Rimkus та співавторів [66]. Для оцінки життєздатності *T. viride* обрано прискорений спосіб, за якого препарат зберігають за температури 30 °С. На початку зберігання зразків препарату, через 2 та 8 тижнів визначали кількість КУО/г *T. viride* КМВ-F-15.

Як видно з даних рис. 3.11, на початку зберігання кількість КУО/ г гриба була більше в зразках препарату №2 та №3, що може пояснюватися внесенням більшої кількості біомаси, оскільки в середовищах №2 та №3

вихід біомаси був вище, ніж у середовищі №1. Проте через 2 тижні зберігання зразків торф'яного препарату на поверхні зразка №1 спостерігалось явне утворення зелених поверхневих конідій, відповідно кількість КУО/г зросла на 2 порядки.

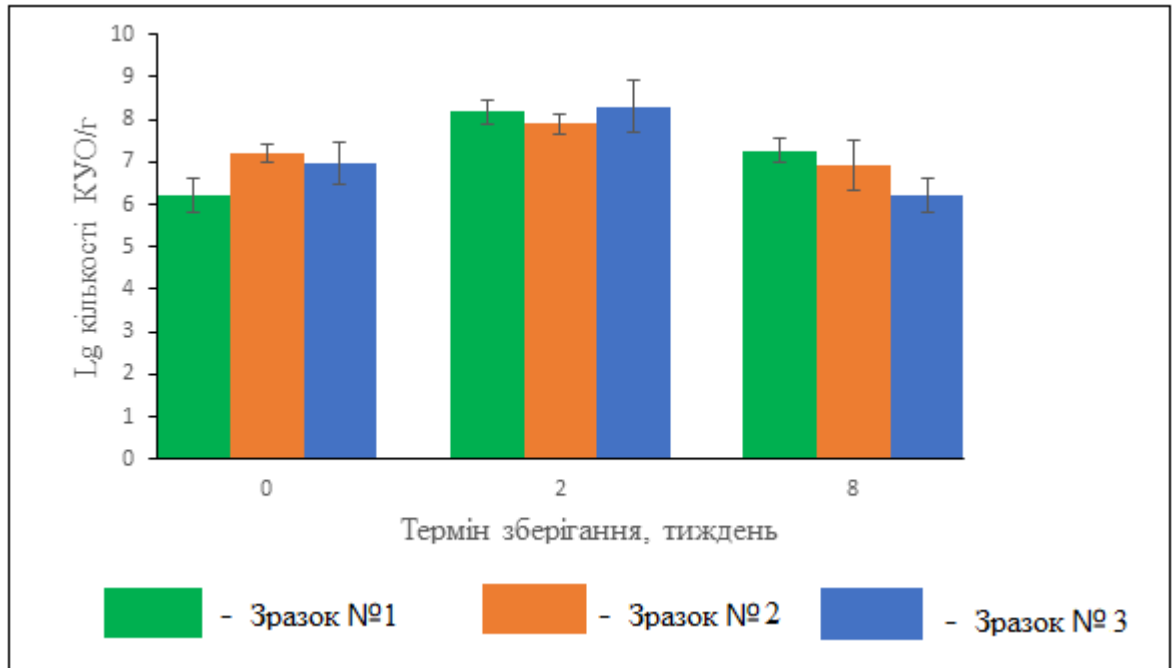


Рис. 3.11. Кількість КУО *T. viride* КМВ-Ф-15 в 1 г торф'яного препарату на різні терміни зберігання за температури 30 °С

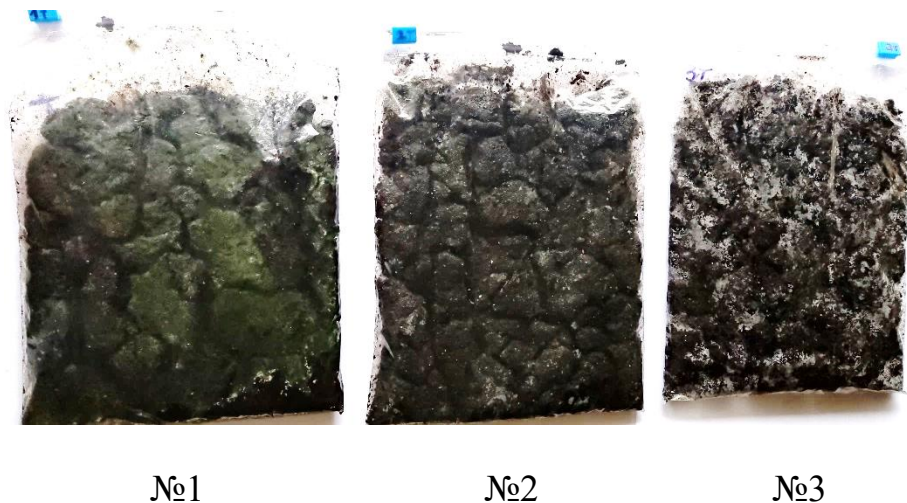


Рис. 3.12. Зовнішній вигляд зразків торф'яного препарату через 2 тижні зберігання за 30 °С

Збільшення кількості КУО/г також спостерігалось для зразків №2 та №3. Цей факт підтверджує думку деяких дослідників, що торф є сприятливим субстратом для підтримки та збільшення кількості клітин мікроорганізмів, внесених у нього [66]. У даному випадку склад середовища, в якому була отримана біомаса гриба не мав вирішального значення для зберігання її життєздатності, як було нами показано для утворення конідій на біомасі, не внесеної у носій. Через 8 тижнів зберігання кількість КУО/г у всіх зразках препарату знизилась порівняно з попереднім визначенням на 2 тиждень, але залишалась на доволі високому рівні, більше ніж 1×10^6 КУО/г, що вважається достатнім для прояву біологічної активності препаратом [70].

Крім визначення кількості КУО/г *T. viride* КМВ-F-15 було досліджено здатність 1 % суспензії препарату, якою просочували паперовий диск, колонізувати поверхню поживного середовища (на 3 добу) та проявляти фунгістатичну активність (на 7 добу) в бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716. Дослід проводили після 8 тижнів зберігання за 30 °С.

Як видно з даних табл. 3.5 та рис. 3.13, зразки торф'яного препарату достовірно не відрізнялися за здатністю до колонізації поверхні поживного середовища.

Таблиця 3.5

Життєздатність та фунгістатична активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15 на 8 тиждень зберігання торф'яного препарату

Зразок препарату	Колонізація поверхні середовища, %	Інгібування росту <i>F. culmorum</i> ІМВ-F-50716, %
№1	$63,6 \pm 2,5^a$	$75,1 \pm 2,6^a$
№2	$61,6 \pm 3,2^a$	$67,4 \pm 5,9^a$
№3	$59,9 \pm 6,1^a$	$76,7 \pm 3,1^a$

Примітка: а – різниці між даними не достовірні (за критерієм Тьюкі, $P > 0,05$).

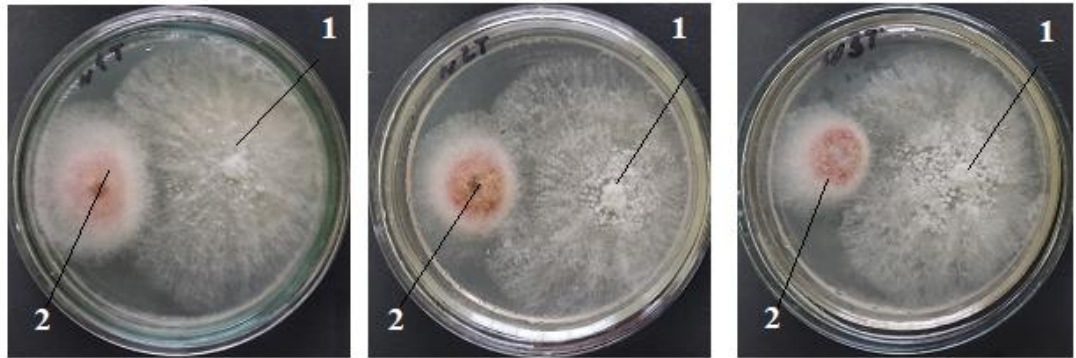


Рис. 3.13 Перевірка життєздатності *T. viride* КМВ-F-15 на 8 тиждень зберігання торф'яного препарату за 30 °С у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716: 1 – *T. viride* КМВ-F-15; 2 – *F. culmorum* ІМВ-F-50716; №1т, №2т, №3т – зразки препарату

Фунгістатична активність відносно фітопатогена *F. culmorum* була достатньо високою (67,4-76,7 % інгібування росту) і також не виявлено достовірної різниці в застосуванні 3 зразків препарату (див. табл. 3.5 та рис. 3.14).

Таким чином, зберігання торф'яного препарату протягом 8 тижнів за температури 30 °С було ефективним, життєздатність *T. viride* КМВ-F-15 була достатньою для прояву високої фунгістатичної активності відносно *F. culmorum* ІМВ-F-50716.

Треба відмітити, що фітопатоген *F. culmorum* – збудник однієї з найнебезпечніших хвороб – фузаріозного в'янення картоплі, а також вражає зернові культури [71]. Мікотоксини, які продукує *F. culmorum* – трихотецени, зеараленон і фузарини, накопичуються в тканинах рослин, можуть потрапляти в продукти харчування та корми і представляти значний ризик для здоров'я людини та тварин [71, 72]. Оскільки збудник передається ґрунтом та через поживні залишки [73], важливим є передпосівна обробка

насінневого матеріалу фунгіцидами, зокрема на основі мікробів-антагоністів фітопатогенів, таких як *Trichodermaspp.* Тому торф'яна форма препарату на основі *T. viride* КМВ-F-15, яка в умовах *invitro* показала ефективність проти збудника фузаріозного в'янення та кореневої гнилі *F. culmorum*, може бути перспективною при використанні в польових умовах.

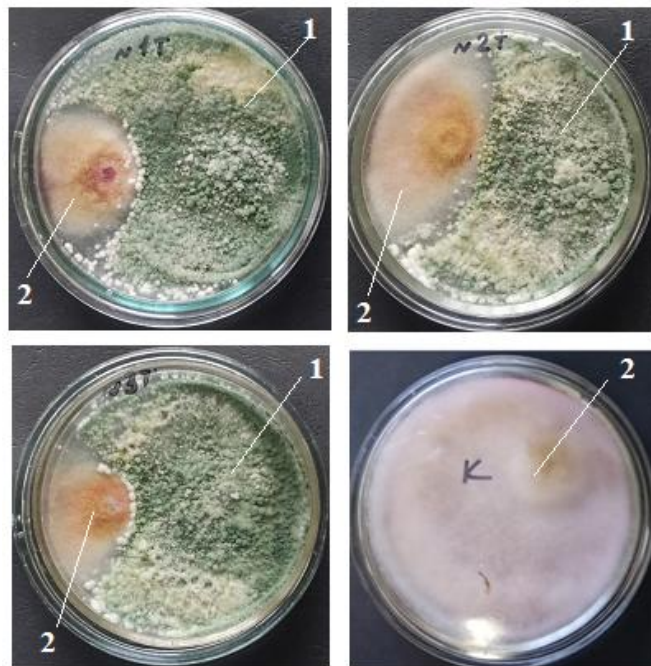


Рис. 3.14 Фунгістатична активність *T. viride* КМВ-F-15 на 8 тиждень зберігання торф'яного препарату за 30 °С у бінарній культурі з *F. culmorum* ІМВ-F-50716: 1 – *T. viride* КМВ-F-15; 2 – *F. culmorum* ІМВ-F-50716; №1т, №2т, №3т – зразки препарату; К – контроль

З даних літератури відомо, що крім антагоністичного ефекту на фітопатогени *Trichodermaspp.* ефективно колонізує корені рослин, прискорює їх розвиток, підвищує засвоєння мінеральних речовин, а також резистентність рослин через активацію захисних механізмів (утворення реактивних видів кисню, супероксиддисмутази, оксиліпіну, фітоалексину) [74,75]. Так, обробка бульб картоплі суспензією спор *T. harzianum*з одночасним внесенням торфу в ґрунт значно підвищило площу листя,

біомасу рослин (надземної та підземної) та довжину кореня, порівняно з контрольними рослинами [75].

ВИСНОВКИ

1. Із 3 досліджених штамів триходерми обрано *T. viride* КМВ-F-15, що характеризується високою антагоністичною активністю до широкого кола збудників хвороб рослин. Найактивніше *T. viride* КМВ-F-15 пригнічувала у бінарній культурі *F. culmorum* ІМВ-F- 50716 (94,42 % інгібування). Стосовно фітопатогенних бактерій найвищу активність мікроміцет-антагоніст показав проти *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ІМВ 7595 – діаметр зони пригнічення росту навколо блоків становив у середньому 15,5 мм. Показано, що культуральна рідина *T. viride* КМВ-F-15 не несе фітотоксичного впливу на проростання ячменю ярого сорту «Шедевр».

2. Показано вирішальний вплив складу поживного середовища для накопичення біомаси *T. viride* КМВ-F-15 в глибинних умовах на утворення конідій, життєздатність та фунгістатичну активність густої біомаси на другому етапі (дозрівання в стаціонарних умовах) двоетапної технології отримання біопрепарату. Для отримання якісного препарату обрано середовище, що містить сахарозу та дріжджовий екстракт. Отримана з нього біомаса (зразок №3) утворювала велику кількість конідій за температури 25 °С та характеризувалася високою життєздатністю (83,79 % колонізації поверхні середовища) та фунгістатичною активністю (85,2 % ієгібування росту *F. culmorum*).

3. Встановлено, що додавання оцтової кислоти (до рН 4) до зразків густої біомаси, отриманої в глибинних умовах у різних середовищах, негативно впливало на утворення конідій та життєздатність міцелію *T. viride* КМВ-F-15. Середовище на основі зеленої патоки та кукурудзяного екстракту сприяло накопиченню хламідоспор під час глибинного культивування, а отримана в ньому біомаса не втрачала життєздатності, проте не утворювала конідії на етапі «дозрівання» та поступалася за фунгістатичною активністю зразку №3.

4. Встановлено, що зберігання торф'яного препарату протягом 8 тижнів за температури 30 °С було ефективним не залежно від складу середовищ на етапі глибинного культивування. Життєздатність *T. viride* КМВ-F-15 була достатньою для прояву високої фунгістатичної активності по відношенню до *F. culmorum* ІМВ-F-50716 (67,4 – 76,7 % інгібування).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Tyskiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszuk-Scisel J. Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 19;23(4):2329.
2. Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R., Kariman K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol. Control.* 2018;117:147–157.
3. Druzhinina I., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A. et al. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9, 2011. – P.749–759
4. Mukesh Srivastava. Trichoderma- a potential and effective biofungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review / Mukesh Srivastava, Vipul Kumar, Mohammad Shahid. // *African Journal of Agricultural Research.* – 2016. – P. 310–316.
5. Nur A. Zin, N. A. Badaluddin. "Biological Functions of Trichoderma Spp. for Agriculture Applications." *Annals of agricultural science*, v. 65, P. 168-178.
6. Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *Int Microbiol.* 2004 Dec;7(4):249-60.
7. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Wood S, Lorito M. Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun.* 2012 Nov;7(11):1545-50.

8. Druzhinina IS, Shelest E, Kubicek CP. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Dec;337(1):1-9.
9. Blaszczyk L, Siwulski M, Sobieralski K, Lisiecka J, Jedryczka M. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research.* 2014;54.
10. Harman, G., Howell, C., Viterbo, A. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2, 43–56 (2004).
11. ZhangJL, TangWL, HuangQR, LiYZ, WeiML, JiangLL, LiuC, YuX, ZhuHW, ChenGZ, ZhangXX. *Trichoderma*: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. *Front Microbiol.* 2021 Jul 23;12:723828.
12. Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, de La Cruz J, Monte E, Llobell A. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5833-9.
13. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, et al. Genome sequence analysis of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) reveals a surprisingly limited inventory of carbohydrate active enzymes. *Nat Biotechnol.* 2008;26:553–560
14. Sartori T, Tibolla H, Prigol E, Colla LM, Costa JA, Bertolin TE. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. *Biomed Res Int.* 2015;2015:342716.
15. Kubicek C.P. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* / C.P. Kubicek, M.E. Penttilä // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological

control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, 1998. – P. 49-72.

16. Biely P. Enzymology of hemicellulose degradation / P. Biely, M. Tenkanen // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 25-47.

17. Berini F, Caccia S, Franzetti E, Congiu T, Marinelli F, Casartelli M, Tettamanti G. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. *Pest Manag Sci.* 2016 May;72(5):980-9.

18. Alfiky A, Weisskopf L. Deciphering *Trichoderma* Plant Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *J Fungi (Basel)*. 2021 Jan 18;7(1):61.

19. Vizcaino J.A., Sanz L., Cardoza R.E., Monte E., Gutierrez S. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species. Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;244:139–148.

20. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Woo S.L., Nigro M., Marra R. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 2008;8:127–139.

21. Xiao-yan S., Qing-tao S., Shu-tao X., Xiu-lan C., Cai-yan S., Yu-zhong Z. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS. Microbiol. Let.* 2006;260:119–125.

22. Utkhede R., Koch C. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol.* 2004;49:305–313.

23. El-Hasan, Abbas et al. "Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens." *European Journal of Plant Pathology* 124 (2009): 457-470.
24. Tanaka J.C.A., da Silva C.C., de Oliveira A.J.B., Nakamura C.V., Dias B.P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006;39:387–391.
25. Al-Obaidi O. Studies on antibacterial and anticancer activity of *Nerium oleander* extracts. *Eur. Chem. Bull.* 2014;3:259–262.
26. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;306:530–536.
27. Saito H., Sakakibara Y., Sakata A., Kurashige R., Murakami D., Kageshima H., Saito A., Miyazaki Y. Antibacterial activity of lysozyme-chitosan oligosaccharide conjugates (LYZOX) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*.- 2019
28. Gardiner D.M., Waring P., Howlett B.J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: Distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology.* 2005;151:1021–1032.
29. Scharf DH, Brakhage AA, Mukherjee PK. Gliotoxin-bane or boon? *Environ Microbiol.* 2016 Apr;18(4):1096-109.
30. Jones R.W., Pettit R.E., 1987. Variation in sensitivity among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* to the antibiotic gliotoxin. *Plant Dis.* 71, 34–36.
31. Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol.* 2007 Nov;8(6):737-46.

32. Brewer D, Mason FG, Taylor A. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. *Can J Microbiol.* 1987 Jul;33(7):619-25.
33. Khan RAA, Najeeb S, Hussain S, Xie B, Li Y. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms.* 2020;8(6):817.
34. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L., Lorito M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2008;72, 80-86
35. Ahluwalia V., Jitendra K., Virendra S.R., Om P.S., Walia S. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Nat. Prod. Res.* 2015;29:914–920.
36. Evidente A, Cabras A, Maddau L, Serra S, Andolfi A, Motta A. Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2H-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *J Agric Food Chem.* 2003 Nov 19;51(24):6957-60.
37. Lin A, Lee TM, Rern JC. Tricholin, a new antifungal agent from *Trichoderma viride*, and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. *J Antibiot (Tokyo).* 1994 Jul;47(7):799-805.
38. Qutob D, Chapman BP, Gijzen M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nat Commun.* 2013;4:1349.
39. Thornton CR, Pitt D, Wakley GE, Talbot NJ. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested composts. *Microbiology (Reading).* 2002 May;148(Pt 5):1263-79.
40. Lu Z, Tombolini R, Woo S, Zeilinger S, Lorito M, Jansson JK. In vivo study of trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible

green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol.* 2004 May;70(5):3073-81.

41. Білай В. І. Мікроскопічні гриби - продуценти антибіотиків / Київ, 1961. – 185 с.
42. Lin Y.R., Lo C.T., Liu S.Y., Peng K.C. Involvement of pachybasin and emodin in self-regulation of *Trichoderma harzianum* mycoparasitic coiling. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:2123–2128.
43. Harman GE, Doni F, Khadka RB, Uphoff N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *J Appl Microbiol.* 2021 Feb;130(2):529-546.
44. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading)*. 2012 Jan;158(Pt 1):17-25.
45. Gajera HP, Katakpara ZA, Patel SV, Golakiya BA. Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Pathog.* 2016 Feb;91:26-34.
46. Swain H, Adak T, Mukherjee AK, Mukherjee PK, Bhattacharyya P, Behera S, Bagchi TB, Patro R, Shasmita, Khandual A, Bag MK, Dangar TK, Lenka S, Jena M. Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. *Microbiol Res.* 2018 Sep;214:83-90.
47. Xu S, Zhou S, Ma S, Jiang C, Wu S, Bai Z, Zhuang G, Zhuang X. Manipulation of nitrogen leaching from tea field soil using a *Trichoderma viride* biofertilizer. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017 Dec;24(36):27833-27842.
48. Chinnaperumal K, Govindasamy B, Paramasivam D, Dilipkumar A, Dhayalan A, Vadivel A, Sengodan K, Pachiappan P. Bio-pesticidal effects of *Trichoderma viride* formulated titanium dioxide nanoparticle and their

physiological and biochemical changes on *Helicoverpa armigera* (Hub.). *Pestic Biochem Physiol.* 2018 Jul;149:26-36.

49. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading)*. 2012 Jan;158(Pt 1):17-25.

50. Watanapokasin R, Sawasjirakij N, Usami S, Kirimura K. Polyploid formation between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* for enhanced citric acid production from cellulose. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007 Nov;143(2):176-86.

51. Zapana-Huarache SV, Romero-Sánchez CK, Gonza APD, Torres-Huaco FD, Rivera AML. Chromium (VI) bioremediation potential of filamentous fungi isolated from Peruvian tannery industry effluents. *Braz J Microbiol.* 2020 Mar;51(1):271-278.

52. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Jul;87(3):787-99.

53. Lukasheva EV, Babayeva G, Karshieva SS, Zhdanov DD, Pokrovsky VS. L-Lysine α -Oxidase: Enzyme with Anticancer Properties. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 22;14(11):1070

54. Adebayo-Tayo BC, Ogunleye GE, Ogbole O. Biomedical application of greenly synthesized silver nanoparticles using the filtrate of *Trichoderma viride*: Anticancer and immunomodulatory potentials. *Polim Med.* 2019 Jul-Dec;49(2):57-62.

55. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading)*. 2012 Jan;158(Pt 1):17-25.

56. Sarsaiya S., Jain A., Fan X., Jia Q., Xu Q., Shu F., Zhou Q., Shi J., Chen J. New insights into detection of a dendrobine compound from a novel endophytic *Trichoderma longibrachiatum* strain and its toxicity against phytopathogenic bacteria. *Front. Microbiol.* 2020;11:337.

57. Oszust K, Pylak M, Frąc M. Trichoderma-Based Biopreparation with Prebiotics Supplementation for the Naturalization of Raspberry Plant Rhizosphere. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 14;22(12):6356.
58. Senkovs M, Dzierkale MT, Rimkus A, Grigs O, Nikolajeva V. Application of a Posttreatment to Improve the Viability and Antifungal Activity of *Trichoderma asperellum* Biomass Obtained in a Bioreactor during Submerged Cultivation. *Biology (Basel)*. 2022 Nov 3;11(11):1610.
59. Пилипчук М. І., Григор'єв А. С., Шостак В. В. Основи наукових досліджень: Підручник. – К.: Знання, 2007. – с. 270 .
60. Biological activity of the liquid preparation Trichoderma in experiments in vitro and in vivo / Hoang L.T., Abdelrakhman A.A., Ivanova V.V., Tkhi T.N., Ryabichko S.S., Fattakhova A.N., Alimova F.K. // *Fundamental research*. - 2011. - No. 11-2. - S. 415-419.
61. Nusrat Jahan. Evaluation of The Growth Performance Of Trichoderma harzianum (Rifai.) on Different Culture Media // *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. – 2013.
62. Sanjeev Kumar. Trichoderma: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases / Sanjeev Kumar // *African Journal of Agricultural Research* – 2014.
63. Lykholat Y.V., Khromykh N.O., Didur O.O. et al. Chaenomeles speciosa fruit endophytic fungi isolation and characterization of their antimicrobial activity and the secondary metabolites composition. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 10, 83 (2021).
64. T. V. Sklyar , O. A. Drehval , N. V. Cherevach , V. L. Matyukha , V. V. Sudak , S. S. Yaroshenko , N. V. Kuragina , Y. V. Lykholat, N. O. Khromykh, O. O. Didur , K. V. Lavrentieva, O. A. Lykholat. Antagonistic activity of microorganisms isolated from chernozem against plant pathogens. *Ukrainian Journal of Ecology Ukrainian Journal of Ecology*, 2020, 10(1), 292-299.
65. Senkovs M, Dzierkale MT, Rimkus A, Grigs O, Nikolajeva V. Application of a Posttreatment to Improve the Viability and Antifungal Activity

of *Trichoderma asperellum* Biomass Obtained in a Bioreactor during Submerged Cultivation. *Biology (Basel)*. 2022 Nov 3;11(11):1610.

66. Rimkus A, Namina A, Dzierkale MT, Grigs O, Senkovs M, Larsson S. Impact of Growth Conditions on the Viability of *Trichoderma asperellum* during Storage. *Microorganisms*. 2023 Apr 21;11(4):1084.

67. Rush TA, Shrestha HK, Gopalakrishnan Meena M, Spangler MK, Ellis JC, Labbé JL, Abraham PE. Bioprospecting *Trichoderma*: A Systematic Roadmap to Screen Genomes and Natural Products for Biocontrol Applications. *Front Fungal Biol*. 2021 Sep 16;2:716511. doi: 10.3389/ffunb.2021.716511. PMID: 37744103; PMCID: PMC10512312.

68. Singh, A.; Shahid, M.; Srivastava, M.; Pandey, S.; Sharma, A.; Kumar, V. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *J. Virol. Mycol*. 2014, 3: 1000127.

69. Sanjiv Kumar, Rakesh Kumar, Hari Om. Shelf-life of *Trichoderma viride* in talc and charcoal based formulations. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2013, 83 (5): 566–569.

70. Suherah, Kuswinanti T., Rosmana A., Rasyid B. The effect of organic medium use in formulation of *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus* in viability and decomposition of cacao pod husks waste. *Pak. J. Biotechnol*. 2018, Vol. 15 (1): 95-100.

71. Дрегваль О.А., Чижевська В.В., Черевач Н.В., Вінніков А.І. Скринінг ґрунтових штамів мікроміцетів – антагоністів грибних і бактеріальних патогенів рослин. *Biosyst. Divers*. 2017, 25 (2): 108 – 112.

72. Wagacha J.M., Muthomi J.W. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*. 2007, 26 (7): 877–885.

73. Khemir E., Chekali S., Moretti A., Gharbi M.S., Allagui M.B., Gargouri S. Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr*. 2020, 59 (1): 187–201.

74. Ruocco M, Lanzuise S, Lombardi N, Woo SL, Vinale F, Marra R, Varlese R, Manganiello G, Pascale A, Scala V, Turrà D, Scala F, Lorito M. Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Mol Plant Microbe Interact.* 2015, 28(2):167–79.

75. Galindo M., Rueda D., Romero P., Medina M., Bangeppagari M., Gangireddygar V. S. R., Mulla S. I. Evaluation of the interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* in the development and nutrition of potato plants (*Solanum phureja*). *Asian J. Agri & Biol.* 2018, 6(3):403-416.

