

Т.І. ЩЕРБАКОВА, кандидат біологічних наук

Державний університет Молдови, Інститут генетики, фізіології

та захисту рослин, вул. Педурій, 20, Кишинів, 2002, Молдова

e-mail: tscerb@gmail.com

ГРИБИ *TRICHODERMA* ДЛЯ ЗАХИСТУ ТЕПЛИЧНИХ КУЛЬТУР ВІД ООМІЦЕТУ *PYTHIUM SP.*

Мета. Виявити високовірулентний гриб *Trichoderma* Pers. ex Fr. для захисту тепличних культур від патогену *Pythium* sp. **Методи.** Об'єктами досліджень були штами/ізоляти грибів *Trichoderma* spp. з робочої колекції лабораторії. Патоген *Pythium* sp. виділено з мінеральної вати, що використовується у гідропонній теплиці. Патогенність *Pythium* sp. визначали методом інфікування проростків огірка у вологій камері за температури 24°C. Для відбору активних штамів *Trichoderma* щодо *Pythium* sp., вивчали їхню антагоністичну активність методом подвійних культур. На 10-ту добу визначали показник інгібування грибів одним (%) **Результати.** За визначення патогенності ізоляту *Pythium* sp. щодо проростків огірка на 4-ту добу настала 100% загибель всіх паростків. При вивченні антагонізму грибів *Trichoderma* та *Pythium* sp. відзначено високу швидкість зростання ооміцету у контролі. Через 50 год після висіву патоген заселив усю агарову пластинку. Однак у подвійних культурах гриби *Trichoderma* стримували зростання ооміцету. На 10-ту добу 4 штами: *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* та *Trichoderma* sp. 1K колонізували патоген з показником інгібування 100%. Інші гриби *Trichoderma* інгібували патоген на 83,5—94,1%. **Висновки.** Штами *Trichoderma* з високою інгібуючою активністю можуть бути використані як продуцент біопрепарату для захисту тепличних культур від ооміцету *Pythium* sp.

***Pythium* sp; *Trichoderma* spp; патоген; штам; антагоністична активність; подвійна культура**

Деякі види ооміцетів *Pythium* spp. дуже агресивні, вражають молоді рослинні тканини огірків, перцю та томатів, що призводить до значних втрат урожаю. Патоген поширюється зооспорами, вихід яких із спорангіїв можливий лише за наявності крапель води. Це створює небезпеку у теплицях з використанням гідропонних технологій.

При вирощуванні рослин у сучасних теплицях, і особливо з вико-

ристанням гідропонних технологій, великого значення набуває здорова коренева система. Підвищена вологість, коливання температурних показників у кореневій зоні нижче норми, низький рівень кисню в поживному субстраті призводять до розвитку корневих гнилей, збудниками яких можуть бути види *Pythium* spp. Рід *Pythium* — це ґрунтові ооміцети від умовно-патогенних до високовірулентних збудників гнилей багатьох видів рослин. Вони є грибоподібними організмами, що відносяться до класу Oomycetes, порядку Peronosporales, сім. Pythiaceae J. Schrot. 1893, поширюються зооспорами, які утворюються в спорангіях, а їх вихід можливий лише за наявності крапель води [1]. Зооспори, що досягли поверхні кореня рослини, перетворюються на цисти, проростають і утворюють гіфи, які виділяють гідролітичні ферменти, що розкладають кореневу тканину. На корінні рослин *Pythium* утворюються ооспори і хламідоспори, які можуть витримувати тривалі несприятливі умови, а це сприяє накопиченню та поширенню патогену в ґрунті, воді та рециркулюючому поживному розчині.

Представники сімейства Pythiaceae — факультативні паразити, деякі види дуже агресивні, уражують понад 150 видів вищих рослин. Більшість видів *Pythium* — збудники захворювань, уражують молоді рослинні тканини гороху, буряків, салату, капусти, редиски, тютюну, тепличних культур огірків, перцю та томатів. Це викликає досходове і післясходове в'янення, зниження сили зростання сянців, що вижили, або їхню загибель. Крім того, вони уражують коріння дорослих рослин, викликаючи кореневу гниль, важкі некрози та затримку росту. Завдані збитки призводять до значних втрат урожаю. Сортів, стійких проти *Pythium* spp., немає.

Мета досліджень — виявити високовірулентний гриб *Trichoderma* Pers. ex Fr. для захисту тепличних культур від патогенного ооміцету *Pythium* sp.

Результати та обговорення. Дослідження проводили у 2022 р. у лабораторних умовах в Інституті генетики, фізіології та захисту рослин у складі Державного університету Молдови.

Об'єктами досліджень були штами грибів *Trichoderma*: *T. virens* CNMN-FD-13, *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14 та *T. harzianum* CNMN-FD-16 (Th-7F) — продуценти біопрепаратів Gliocladiñ-SC, Trichodermină-SC, Trichodermină-BL та Trichodermină Th-7F-BL, внесені до Державного реєстру коштів фітосанітарного призначення Молдови [2], а також перспективні ізоляти із робочої колекції. Патоген *Pythium* sp. виділено з мінеральної вати, яка використовується в гідропонній теплиці, ооміцет виділяли з усіх проб, взятих у різних частинах теплиці площею 3 га.

Патогенність *Pythium* sp. визначали методом інфікування проростків огірка сорту Конкурент: 4-денні проростки поміщали у вологу

камеру в чашки Петрі з агаровим диском діаметром 10 мм, зарослим 5-денною культурою ооміцету. Інкубували при температурі 24°C, спостерігали щодня [3].

Для виявлення найбільш активних штамів/ізолятів *Trichoderma* по відношенню до *Pythium* sp., вивчали їхню антагоністичну активність методом зустрічних культур на агаровому поживному середовищі, що містить картопляний відвар. Посів блоками, повторність триразова [4]. Культивували при температурі 28°C — оптимальній для досліджуваних грибів. Радіус колоній вимірювали щодня лінійним методом (мм), на 6-ту та 10-ту добу обчислювали показник інгібування грибів один одним (%). Оцінювали в балах ступінь наростання антагоніста на колонію *Pythium*: 0 балів — наростання немає, 1 бал — антагоніст займає 25% площі колонії патогену, 2 бали — 25—50%, 3 бали — 51—75%, 4 бали — антагоніст займає 76—100% площі колонії патогену [5]. Проводили мікроскопування грибів у зонах наростання.

Для визначення антифунгальної активності грибів *Trichoderma* по відношенню до *Pythium* sp. використовували фугат (нативну культуральну рідину). Вивчали методом дифузії в агар з використанням металевих циліндриків [4].

Принцип використання живих мікроорганізмів у захисті рослин будується на явищах антагонізму — це можливість гноблення, витіснення та придушення одних видів мікроорганізмів іншими. Антагонізм виникає в результаті безпосередньої взаємодії між двома мікроорганізмами, що займають ту саму екологічну нішу. Широко поширеними в природі антагоністами фітопатогенів є гриби *Trichoderma*, вони мають у своєму розпорядженні низку механізмів, що дають можливість придушувати багатьох збудників хвороб культурних рослин. До цих механізмів відносять: мікопаразитизм, антибіоз, конкуренцію за поживні речовини та за простір (швидке розмноження антагоніста та витіснення патогену), стійкість до стресів, інактивацію ферментів фітопатогенів. Гриби *Trichoderma* є швидкорослими, в чистій культурі через 4—6 діб після висіву блоком заселяється вся агарова платівка чашки Петрі [6, 7].

При визначенні патогенності ізоляту *Pythium* sp. щодо проростків огірка відзначено, що вже на 3-тю добу патоген виявив високу вірулентність, стеблинки паростків стали водянистими, при дотику тканина розкладалася, на 4-ту добу настала 100% загибель всіх паростків. За мікроскопіювання в рослинних клітинах виявлено велику кількість ооспор (рис. 1).

При вивченні антагоністичних взаємин грибів *Trichoderma* та *Pythium* sp. відзначена висока швидкість зростання ооміцету. Через 24 години радіус колонії *Pythium* sp. у контролі становив 45 мм, через 50 годин була заселена вся агарова пластинка. Однак у подвійних

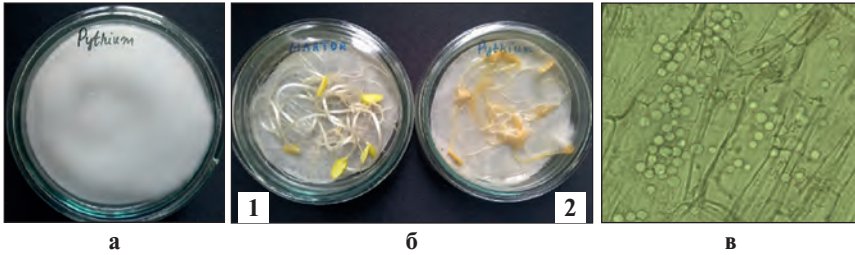


Рис. 1. Визначення патогенності ізоляту *Pythium* sp. до проростків огірка: а — чиста культура *Pythium* sp., контроль; б — паростки, 1 — контроль, 2 — загнилі інфіковані *Pythium* sp.; в — оїдії *Pythium* sp. у клітинах проростка, $\times 400$

культурах гриби *Trichoderma* стримували зростання ооміцету, радіус колонії *Pythium* sp. через 48 год зростання становив від 41 мм у культурі з *T. koningii* до 68 мм у культурі з *T. virens* CNMN-FD-13 (від 20 до 51%). На третю добу та у наступні дні у всіх варіантах колонії грибів *Trichoderma* збільшувалися і почався процес колонізації патогену (рис. 2, табл. 1).

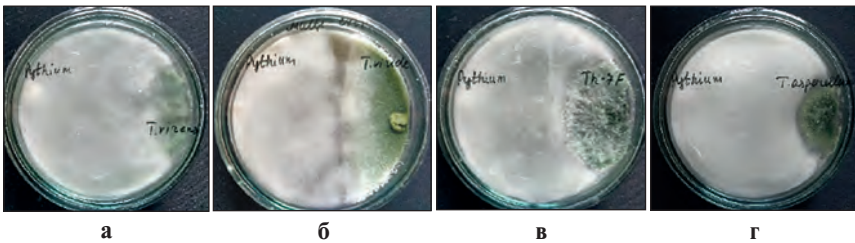


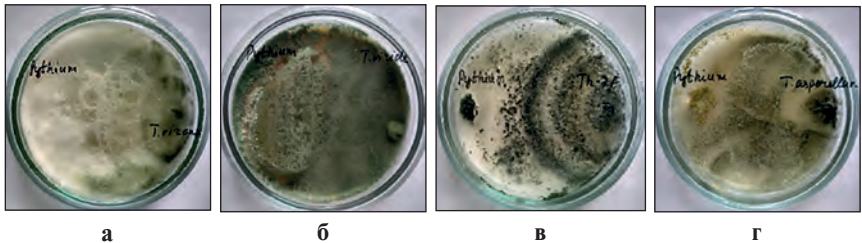
Рис. 2. Подвійна культура ооміцету *Pythium* sp. і грибів *Trichoderma* на третю добу зростання: а — *T. virens* CNMN-FD-13; б — *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14; в — *T. harzianum* CNMN-FD-16 (Th-7F); г — *T. asperellum*

Високу антагоністичну активність до *Pythium* sp. виявили штами *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* та ізолят *Trichoderma* sp. 1К, до десятого дня зростання вони повністю колонізували патоген із показником інгібування 100%. У штамів *T. virens* CNMN-FD-13 і *T. harzianum* CNMN-FD-16 антагонізм до ооміцету виявився дещо слабшим, на 6-ту добу зростання показник інгібування становив 80,0 і 81,2%, на 10-ту добу — 89,4 та 83,5%, відповідно, зі ступенем наростання на патоген 4 бали. Ізоляти *Trichoderma* sp. 13т, sp. 2N та sp. 14N на 10-ту добу інгібували патоген на 87—94% (табл., рис. 3).

За характером росту гриби *Trichoderma* у подвійній культурі вияв-

**Характеристика антагоністичної взаємодії грибів *Trichoderma*
та ооміцета *Pythium* sp. у подвійній культурі**

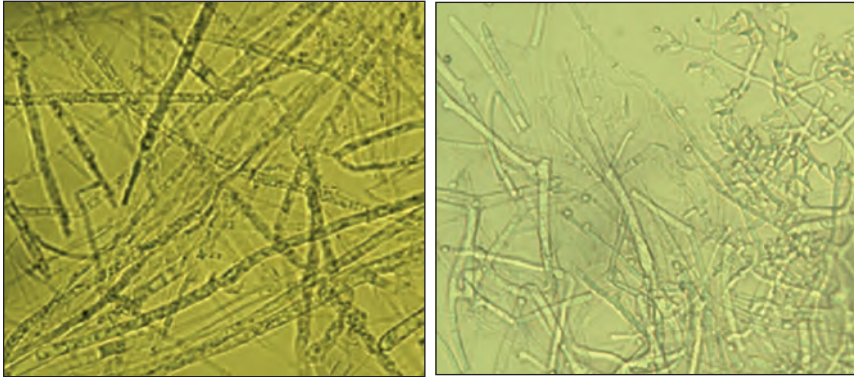
% інгібування	Варіант — подвійна культура	Радіус колоній, мм				% інгібування		Бал наростання штаму на патоген
		Доба				на 6-ту добу	на 10-ту добу	
		2-га	3-тя	6-та	10-та			
1	<i>T. virens</i> FD-13 <i>Pythium</i> sp.	17±0,9 68 ±0,9	18±1,5 67±1,4	68±1,6 17±1,0	76±0,3 9±0,7	20,0 80,0	10,6 89,4	4
2	<i>T. lignorum</i> FD-14 <i>Pythium</i> sp.	30±0,3 55±0,6	34±1,0 51±1,0	48±1,5 37±1,5	85±0 0	43,5 56,5	0 100	4
3	<i>T. harzianum</i> FD-16 <i>Pythium</i> sp.	26±1,0 58±1,1	34±1,0 51±1,0	69±1,0 16±1,0	71±1,5 14±1,5	18,8 81,2	16,5 83,5	4
4	<i>T. asperellum-</i> <i>Pythium</i> sp.	21±0,6 65±0,7	25±0,3 61±0,6	84±0 1±0	85±0 0	1,2 98,8	0 100	4
5	<i>T. koningii</i> <i>Pythium</i> sp.	44±0,3 41±0,5	45±0,3 40±0,6	67±1,7 18±0,9	85±0 0	21,2 78,8	0 100	4
6	<i>Tr.</i> sp. 2N <i>Pythium</i> sp.	24±0,6 61±0,7	25±0,3 60±0,3	66±0,6 19±0,6	75±0,6 10±0,5	22,4 77,6	11,8 88,2	4
7	<i>Tr.</i> sp. 14N <i>Pythium</i> sp.	24±1,0 61±1,0	26±1,0 59±1,2	68±0,6 17±1,5	80±0 5±0	20,0 80,0	5,9 94,1	4
8	<i>Tr.</i> sp. 13T <i>Pythium</i> sp.	20±0,6 68±0,3	25±0,3 66±1,5	57±1,5 25±1,7	74±1,5 11±1,7	32,9 70,6	12,9 87,1	4
9	<i>T.</i> sp. 1K <i>Pythium</i> sp.	20±0,6 65±0,7	25±0,3 60±0,3	82±0 3±0	85±0 0	3,5 96,5	0 100	4
10	<i>Pythium</i> sp. контроль	75±0	85±0	85±0	85±0	—	—	—



**Рис. 3. Подвійна культура ооміцету *Pythium* sp. і грибів *Trichoderma* на десяту добу зростання:
а — *T. virens* CNMN-FD-13; б — *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14;
в — *T. harzianum* CNMN-FD-16 (Th-7F); г — *T. asperellum***

ляли фунгістатичний аліментарний та територіальний антагонізм, при якому відбувалося наростання колонії гриба *Trichoderma* на поверхню фітопатогенної колонії, в результаті його зростання припинялося.

Мікроскопіювання подвійних культур у зонах наростання антагоністів на колонію *Pythium* sp. проводили на 10-ту добу. В результаті було зазначено, що найчастіше гриби *Trichoderma* руйнували міцелій ооміцету, це спостерігалось у культурі з *T. harzianum*, *T. virens*, *T. lignorum*, *Trichoderma* sp. 14N (рис. 4).



а

б

Рис. 4. Мікроскопіювання подвійних культур у зонах наростання антагоністів на колонію *Pythium* sp.: а — чиста культура *Pythium* sp., контроль, $\times 400$; б — руйнування міцелію у присутності *T. harzianum*, $\times 400$

Потужний інгібуючий ефект, деформація та лізис міцелію відзначені у культурі з *T. koningii*. У присутності *T. asperellum* виявлено деформацію та руйнування ооспор (в інших культурах ооспор не помічено). У культурі з *T. lignorum* спостерігали утворення антеридіїв, які у чистій культурі *Pythium* sp. трапляються не часто.

Фунгіцидну активність фугату культуральної рідини щодо патогену *Pythium* sp. визначали методом дифузії агар з використанням металевих циліндриків. За підсумками експерименту зазначено, що метаболіти, які утворюються в процесі культивування грибів *Trichoderma* в рідкій культурі, не надають інгібуючої дії на ооміцет. Ймовірно, такого агресивного патогену може пригнічувати, знижувати та витіснити лише жива культура антагоніста.

ВИСНОВОК

В результаті проведених досліджень встановлено, що ооміцет *Pythium* sp., виділений з тепличного субстрату, є агресивним пато-

геном, при інфікуванні проростків огірка їх загибель відзначена на 4-ту добу. Ооміцету *Pythium* sp. властива висока швидкість зростання на агарових середовищах з картопляним відваром, однак у подвійній культурі через 2 доби гриби *Trichoderma* стримували зростання патогену на 20—51%. Високу антагоністичну активність щодо *Pythium* sp. виявили штами *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* та ізолят sp. 1К. До десятого дня зростання вони повністю колонізували патоген із показником інгібування 100%. Культури *Trichoderma* виявили фунгістатичний аліментарний та територіальний антагонізм, пряме паразитування на патогені *Pythium* sp. та пригнічення розвитку міцелію. Штами *Trichoderma* з високою інгібуючою активністю можуть бути використані як продуцент біопрепарату для захисту тепличних культур від ооміцету *Pythium* sp.

Фінансування: дослідження проведено у рамках проекту Державної Програми 20.80009.7007.16 «Синергізм між природними факторами та екологічно нешкідливими мікробіологічними засобами регулювання щільності популяцій шкідників для захисту сільськогосподарських культур у традиційному та органічному сільському господарстві», за фінансової підтримки Національної агенції з досліджень та розвитку республіки Молдова (ancd.gov.md).

Конфлікт інтересів: автор декларує відсутність конфлікту інтересів.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Пыстина К.А. Определитель грибов. Класс Оомицеты. Род *Pythium* Pringsh. Вып. 2. 1998. Издательство Наука, 118 с.
2. Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizantilor, permise pentru utilizare în RM. [online]. URL: <http://www.pesticide.md/registrul-de-stat/> (дата звернення 25.08.23).
3. Бёттхер И., Ветцель Т., Древис Ф.В. и др. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. /пер. с немецкого Попковой К.В., Шмыгли И.А. Москва: Агропромиздат, 1987. 224 с.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. Москва: Наука, 2004. 528 с.
5. Поликсенова В.Д., Храмов А.К., Пискун С.Г. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов». Минск: БГУ, 2004, 36 с.
6. Guzmán-Guzmán P. et. al. *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases — A Review. J. Plants. 2023. 12(3). 432. <https://doi:10.3390/plants12030432>
7. Tyskiewicz R. et. al. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application

in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. International J. Molecular Sciences. 2022. 23. 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Scerbacova T., ORCID: 0000-0002-2632-325X
State University of Moldova, Institute of Genetics,
Physiology and Plant Protection, Chisinau, 2002,
20, Paduriy str., Chisinau
e-mail: tscerb@gmail.com

Trichoderma fungi for the protection of greenhouse crops against oomycete *Pythium* sp.

Goal. To identify a highly virulent fungus *Trichoderma* Pers. ex Fr. to protect greenhouse crops from the pathogen *Pythium* sp. **Methods.** The objects of research were strains/isolates of *Trichoderma* sp. from the working collection of the laboratory. The pathogen *Pythium* sp. was isolated from mineral wool used in a hydroponic greenhouse. The pathogenicity of *Pythium* sp. was determined by infecting cucumber seedlings in a humid chamber at 24°C. To select active strains of *Trichoderma* against *Pythium* sp., their antagonistic activity was studied by the method of double cultures. On day 10, the inhibition rate of fungi by each other (%) was determined. **Results.** When determining the pathogenicity of the isolate *Pythium* sp. against cucumber seedlings on day 4, 100% death of all sprouts occurred. When studying the antagonism of *Trichoderma* and *Pythium* sp. fungi, a high growth rate of oomycete was observed in the control. In 50 h after sowing, the pathogen colonized the entire agar plate. However, in double cultures, *Trichoderma* fungi inhibited the growth of oomycete. On day 10, 4 strains: *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* and *Trichoderma* sp. 1K colonized the pathogen with an inhibition rate of 100%. Other *Trichoderma* fungi inhibited the pathogen by 83.5—94.1%. **Conclusions.** *Trichoderma* strains with high inhibitory activity can be used as a producer of a biological product for the protection of greenhouse crops from *Pythium* sp. oomycete.

***Pythium* sp; *Trichoderma* spp; pathogen; strain; antagonistic activity; dual culture**

REFERENCE

1. Pystina K.A. (1998). Opredelitel' gribov. Klass Oomitsety. Rod *Pythium* Pringsh. Vyp. 2. Izdatel'stvo: Nauka, 118 s. (in Russian).
2. Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizantilor, permise pentru utilizare în RM. [online]. URL: <http://www.pesticide.md/registrul-de-stat/> (date of application 25.08.23).

3. Bettkher I., Vetsel' T., Drevs F.V. i dr. (1987). (translation from German by Popkova K.V., Shmygli I.A.). *Metody opredeleniya bolezney i vrediteley sel'skokhozyaystvennykh rasteniy*. Moskva: Agropromizdat, 224 s. (in Russian).
4. Egorov N.S. (2004). *Osnovy ucheniya ob antibiotikakh*. Moskva: Nauka, 528 s. (in Russian).
5. Poliksenova V.D., Khramtsov A.K., Piskun S.G. (2004). *Metodicheskie ukazaniya k zanyatiyam spetspraktikuma po razdelu «Mikologiya. Metody eksperimental'nogo izucheniya mikroskopicheskikh gribov»*. Minsk: BGU, 36 s. (in Russian).
6. Guzmán-Guzmán P., Ajay Kumar A., Santos-Villalobos S. de los, Fannie I. Parra-Cota, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Ayomide Emmanuel Fadiji, ..., Gustavo Santoyo. (2023). *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases — A Review. *J. Plants*, 12(3), 432. <https://doi:10.3390/plants12030432>
7. Tyskiewicz R. et. al. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International J. Molecular Sciences*, 23, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Надійшла до редакції: 05.09.2023. **Прийнята до друку:** 09.09.2023

Надруковано: грудень, 2023

Опубліковано онлайн: лютий, 2024