

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького**

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня «Бакалавр»

**МІКРОМІЦЕТИ *Trichoderma spp.* – АЛЬТЕРНАТИВА
СИНТЕТИЧНИМ ЗАСОБАМ ЗАХИСТУ РОСЛИН**

Виконала: студентка 4 курсу

Групи 1, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

_____ Бардиш І. І.

Керівник: к. б. н.,

доцентка кафедри біотехнологій та радіології

_____Шемедюк Н. П.

Рецензент: к. б. н.,

доцентка кафедри фармації та біології

_____Грицина М. Р.

Роботу заслухано на засіданні кафедри біотехнологій та радіології і
рекомендовано до захисту, протокол № __від____ 20__ р.

Завідувач кафедри біотехнологій та радіології, професор, доктор с.-г. наук
Буцяк В. І. _____

Львів – 2026

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1. 1. Систематичне положення, біологічні особливості, перспективи представників роду <i>Trichoderma</i>	8
1. 2. Вторинні метаболіти представників роду <i>Trichoderma</i>	10
1. 2. 1. Мовчазні метаболічні шляхи <i>Trichoderma spp.</i>	17
1. 3. Механізми біологічної дії мікроміцетів <i>Trichoderma spp.</i>	17
1.3. 1. Індукування системної стійкості рослин представниками <i>Trichoderma</i> та їх нематоцидна дія.....	24
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ.....	28
2. 1. Матеріали дослідження.....	28
2. 1. 1. Біопрепарат.....	28
2. 1. 2. Середовище Чапека.....	28
2. 1. 3. Зерновий субстрат.....	30
2. 2. Методи дослідження.....	30
2. 2. 1. Одержання чистої культури мікроміцетів роду <i>Trichoderma</i>	30
2. 2. 2. Одержання глибинної культури мікроміцетів роду <i>Trichoderma</i>	31
2. 2. 3. Мікроскопування мікроорганізмів.....	31
2. 2. 4. Культивування мікроміцетів роду <i>Trichoderma</i> на зерновому субстраті.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	32
3.1. Узагальнення наукових даних щодо біологічних особливостей <i>Trichoderma spp.</i> . Вивчення механізмів біологічної дії <i>Trichoderma spp.</i> як агента біоконтролю	32
3. 2. Виділення <i>Trichoderma spp.</i> , отримання чистої культури та культивування	

на живильних середовищах, аналіз морфолого-культуральних ознак.....	33
3. 3. Опрацювання біотехнології створення засобів захисту рослин на основі <i>Trichoderma spp</i>	36
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

АНОТАЦІЯ

Актуальність теми. Використання біопестицидів як альтернативи синтетичним пестицидам у сільському господарстві набуває актуальності у зв'язку з занепокоєння громадськості щодо здоров'я людини, безпеки продуктів харчування та впливу на навколишнє середовище. Пріоритетність у всьому світі, у Європі зокрема, надається комплексній біологізації сільськогосподарських виробництв, екологізації землеробства та формування загальної культури застосування засобів захисту рослин, неодмінним елементом якої стають біопрепарати. На законодавчому рівні впроваджуються Директиви, які обмежують неконтрольоване використання хімічних пестицидів, стимулюють впровадження інтегрованої боротьби зі шкідниками, розвиток ринку ефективних біопрепаратів, створення нових розробок у цьому керунку. Біологічними методами захисту рослин є методи захисту від шкідників, захворювань із використанням природних конкурентів. Наприклад, *Trichoderma spp.* – це з одного боку добре вивчені мікроміцети, які є одними з найбільш поширених мікробіологічних агентів біоконтролю фітопатогенів, а з іншого – детальніше вивчення геному цих організмів вказує на їх потенціал, який ще потребує уваги з боку науковців. *Trichoderma spp.* входить до складу біопестицидів, біодобрих, стимуляторів росту рослин та індукторів їх природної стійкості. Ефективність *Trichoderma spp.* можна пояснити здатністю посилювати вегетативний ріст рослин та стримувати популяції фітопатогенів, також ці мікроміцети володіють властивостями: солубілізації, біодеградації рослинних решток, біоремедіації.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідити біологічні особливості *Trichoderma spp.*, вивчити біотехнологію одержання біологічних засобів захисту рослин на основі *Trichoderma spp.*

Завдання дослідження:

1. Узагальнити наукові дані щодо біологічних особливостей *Trichoderma spp.*. Вивчити механізми біологічної дії *Trichoderma spp.* як агента біоконтролю;
2. Виділити *Trichoderma spp.*, отримати чисту культуру та культивувати на живильних середовищах, проаналізувати морфолого-культуральні ознаки;
3. Опрацювати біотехнологію створення засобів захисту рослин на основі *Trichoderma spp.*

Об'єкт дослідження: біологічні особливості *Trichoderma spp.*, біотехнологічні основи створення засобів захисту рослин.

Предмет дослідження: *Trichoderma spp.*, морфолого-культуральні ознаки біотехнологія одержання засобів захисту рослин.

Методи дослідження: аналіз наукової літератури, методи порівняльного аналізу, узагальнення, мікробіологічні, технологія одержання біопрепарату.

Практична цінність роботи. Опрацьовано біотехнологію одержання біомаси *Trichoderma spp.* як компонента біопрепаратів засобів захисту рослин. Результати цього дослідження можуть мати практичне застосування у галузі агробіотехнології та біологічного контролю, екологічно орієнтованого землеробства. Також практична цінність роботи полягає в отриманні біомаси *Trichoderma spp.* для створення продуктів сільськогосподарського призначення.

Апробація результатів дослідження. Бардиш І. І., Шемедюк Н. П. Мікроміцети *Trichoderma spp.* – альтернатива синтетичним засобам захисту рослин. Збірник тез доповідей Студентської наукової конференції «Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького» (Львів 21-22 квітня 2026 року) Ч. 2. Факультет харчових технологій та біотехнології. Львів, ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 2026. С.125.

ВСТУП

Традиційно захист сільськогосподарських культур базується на використанні хімічних пестицидів для боротьби з фітопатогенами рослин та шкідниками, що може мати негативні наслідки для: людини, тварини як кінцевого споживача сільськогосподарської продукції; запилювачів; корисних мікроорганізмів екосистеми; самої рослин, унаслідок пригнічення її індукованої стійкості. Тільки в Європі використання синтетичних агрохімічних препаратів оцінюється приблизно у 250 тис. тонн, з яких близько 180 тис. тонн на рік – це фунгіциди. Біопестициди – це засоби захисту сільськогосподарських культур, які отримано з природних джерел. Це застосування природних хімічних речовин, феромонів, бактерій, грибів та комах-хижаків. Окремі штами мікроорганізмів використовуються як активні інгредієнти біопестицидів з метою інтегрованої боротьби зі шкідниками, фітопатогенами, сприяють росту та/або індукують стійкість рослин до захворювань [23].

Мікроміцети здавна цікаві як біотехнологічні об'єкти завдяки унікальній здатності до синтезу вторинних метаболітів зі значним потенціалом для медицини, ветеринарії, фармації. *Trichoderma* – це добре вивчені мікроміцети, які займають у природі різні екологічні ніші та широко використовуються як засоби біоконтролю (Cai et al., 2013; Bhardwaj and Kumar, 2017; McMullin et al., 2017). Також *Trichoderma* є модельним організмом для вивчення взаємодії рослин і мікроорганізмів. Кілька штамів *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. virens* та *T. viride*) успішно використовуються як потужні засоби біоконтролю у всьому світі (Bhardwaj and Kumar, 2017). Вони здатні стимулювати ріст рослин, стійкість до стресу та доступність поживних речовин. Вторинні метаболіти *Trichoderma* – це різні класи природних сполук з низькою молекулярною масою, з широким спектром біологічної дії. Потенційно важливі вторинні метаболіти *Trichoderma* отримано останніми роками [21, 23].

З прикладної точки зору, удосконалення біотехнології одержання та застосування триходерми є важливим напрямком розвитку, оскільки біопрепарати на основі *Trichoderma spp.* відіграють важливу роль у сталому розвитку сільського господарства, агробіотехнології.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. 1. Систематичне положення, біологічні особливості, перспективи представників роду *Trichoderma*

Trichoderma – це рід мікроміцетів (табл. 1), його вперше описано у 1794 році (Persoon, 1794 р.). Представники цього роду добре адаптовані до різних екологічних ніш і є колонізаторами більшості типів ґрунтів, коренів та надземної маси рослин. Також вони поширені на деревині, що гниє, у внутрішніх тканинах рослин-господарів наземних та морських водоростей, губок, коралів, рослин мангрових заростей. Це ендofітні мікроміцети. Види *Trichoderma* морського середовища та ендofітні не до кінця вивчені [9, 18].

Існує понад 370 видів роду *Trichoderma*. Одні з них використовуються як засоби біоконтролю, другі є перспективними продуцентами ензимів для промислових цілей. Види *Trichoderma* мають унікальну здатність синтезувати різні вторинні метаболіти з потужною біологічною активністю (*T. harzianum*, *T. brevicompactum*, *T. virens*, *T. gamsii*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. koningii*, *T. citrinoviride*, *T. neokongii*, *T. spirale*, *T. afroharzianum*, *T. polypore*, *T. polyalthiae*, *T. erinaceum* та *T. cremeum*). Одними з найпотужніших і важливих біотехнологічних об'єктів вважаються *T. harzianum* та *T. brevicompactum* з 48-ма та 33-ома ідентифікованими метаболітами відповідно [27-31].

Таблиця 1

Систематичне положення мікроміцетів *Trichoderma* spp.

Домен	Еукаріоти
Царство	Гриби
Відділ	<i>Ascomycota</i>
Клас	<i>Sordariomycetes</i>
Порядок	<i>Hypocreales</i>
Родина	<i>Hypocreaceae</i>
Рід	<i>Trichoderma</i>

Конідії мають яйцеподібну форму, утворюються на клітинах плодового тіла (рис. 1). Для конідієносців притаманне сильне галуження, вони септовані. За певних умов на міцеліальних структурах формуються хламідіоспори, що відзначаються товстою клітинною стінкою, володіють стійкістю до різних умов довкілля [9, 18].



Рис. 1. Культура *Trichoderma spp.* на чашках Петрі, мікроскопування. Білі ділянки не містять спор, тоді як зелені ділянки вкриті щільними масами спор (конідій)

Trichoderma spp. – факультативний аероб (може існувати за малих концентрацій вільного Оксигену чи без нього). Гриб вільноживучий, здатний вступати у симбіоз з рослинами. Внаслідок симбіозу підвищується ефективність колонізації ґрунтового середовища. Мікроорганізми поширені у широкому температурному діапазоні [9, 18].

Види *Trichoderma* важливі завдяки синтезу ензимів, здатності прискорювати ріст рослин та біоконтролю захворювань. Це вказує на перспективу їх використання у промисловості, сільському господарстві та медицині [3, 8, 28-31].

В останні роки інтенсивно проводяться дослідження геному, транскриптому, протеому та метаболізму *Trichoderma spp.* [17, 26].

Завдяки дослідженню геному створено бібліотеку кДНК *T. harzianum* та ідентифіковано кілька нових генів [6]

Завершено секвенування геному *T. reesei*, *T. virens* та *T. atroviride*. Після 20-ти годинного інкубування томатів у середовищі з *T. hamatum* T7 досліджено 200 генів, які експресуються, з них: для 166-ти відзначено підвищений рівень експресії порівняно з контролем, для 34-ох – знижений; 43,14% генів пов'язані з синтезом біологічно активних сполук, 56,86% – з біологічними процесами, а 32,0% – з формуванням клітинних компонентів [6, 26].

Дослідження протеому *Trichoderma spp.*, пов'язано з вивченням протеїнів, які пригнічують фітопатогени, серед них: хітиназа, супероксиддисмутаза, ізофлавоноредуктаза.

Досліджено тристоронні взаємодії *Arabidopsis-Trichoderma-Pseudomonas Syringae* і кореляцію між експресією генів та фактом таких взаємодій. У результаті обробка коренів *Arabidopsis* триходермою упродовж 48 годин спричинила понад 300 змін експресії генів у клітинах коренів порівняно з інтактною рослиною. Зміна експресії генів у клітинах лисків відрізнялась від такої у клітинах тканин коренів. Висновок, *Trichoderma spp.* здатна спричиняти зміну експресії генів рослини-господаря [22, 26].

1. 2. Вторинні метаболіти представників роду *Trichoderma*

Кількість метаболітів, що продукують представники роду *Trichoderma*, становить понад 1000 сполук (Zeilinger et al., 2016). У огляді Рейно станом на 2008 р. охарактеризовано 186 сполук, виділених з *Trichoderma*, а також описано їх біологічну роль. 203 сполуки охарактеризовано з початку 2009 року по кінець 2020 року [25].

Такі дослідження є підставою очікувати розробки нових біопрепаратів найближчим часом [10, 11]. Серед цих сполук – 45 з антифунгіцидною дією.

Вторинні метаболіти *Trichoderma spp.* класифікують: **терпеноїди** (трихотеценові сесквітерпени, каротанові сесквітерпени, кадинанові сесквітерпени, циклонеранові сесквітерпени, дриманові сесквітерпени,

харзіанові дитерпени та інші), **циклопептиди, дикетопиперазини, алкалоїди та нітореновмісні сполуки, полікетиди** (похідні нафталіну, октакетиди, цитохалазани та інші) [13, 25].

Терпеноїди. Серед терпеноїдів найширшою групою є трихотеценові сесквітерпени. Трихотецени продукують кілька родів мікроміцетів. Це сполуки на основі сесквітерпенів, що мають трициклічний 12,13-епокситрихотек-9-еновий скелет. На сьогоднішній день виявлено понад 200 похідних трихотецену. Трихотецени, виділені з видів *Trichoderma*: триходермарини, триходермол, триходермін, трихобреоли, харціануми. Цікавими є ендوفіти морських водоростей за можливістю синтезу трихоцетенів, які не продукують наземні види. *Trichoderma brevicompactum* ADL-9-2, який отримано як ендوفіт морської водорості *Chondria tenuissima*, лише за умови культивування у морській воді і Натрій йодиду здатний до синтезу нових відкритих трихоцетенів, серед яких: трихотецинол А, 8-дезокситрихотецин та трихотецинол В [13, 25].

Види *Trichoderma*, є потужними продуцентами нових терпеноїдів. Слід зазначити, що деякі терпеноїди, такі як харціани, виділені виключно з видів *Trichoderma* [13, 25].

Трихоцетени володіють антимікробною активністю проти *Botrytis cinerea*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* та *Phomopsis asparagi*, *Colletotrichum*; антифунгальну активність проти *Candida albicans* та *Cryptococcus*. Новий дитерпеновий харціан харціанол І активний проти *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* та *Micrococcus luteus* [13, 25].

Сесквітерпени каротану зазвичай зустрічаються у рослинах. Однак приблизно 10 сполук було виділено з нитчастих грибів, що є рідкісним класом метаболітів мікроміцетів, зокрема морської *T. virens*. Сесквітерпени циклонерану, дриману, кадінану – метаболіти видів *Trichoderma*. Дослідження ендوفітів водоростей є й досі величезним потенціалом відкриття нових сесквітерпенів [25].

Циклопептиди. Біоаналіз рослинного ендofіта *T. harzianum* KZ-20 дозволив отримати чотири нові циклодепсипептиди, що належать до родини деструксинів. Деструксини – це рідкісні циклічні гексадепсипептиди [13, 25].

Серед **алкалоїдів** та інших нітрогеновмісних сполук: трихотіонова кислота, триходераміди, триходини, нітрогеновмісний гетероциклічний сидерофор з *T. harzianum* M10, атріходермон А [13, 25].

Серед **полікетидів**: триходермінова кислота А та В виділені з ендofітного гриба *T. spirale* та охарактеризовані як нові похідні октагідронафталіну; трихохарціанол ідентифіковано з штаму *T. harzianum* F031; трихохарзин морських видів. Конінгін L та трихокетид А отримано з *Trichoderma koningiopsis* QA-3. Щодо полікетидів, досліджено селективну антимікробну активність проти *B. cinerea*, *F. oxysporum* та *C. lagenarium* [13, 25].

Цитохалазани є різновидом нових продуктів метаболізму грибів, на сьогоднішній день описано понад 100 цитохалазанів. Ці метаболіти містять поліциклічний скелет та ізоіндольний фрагмент. До цих сполук відносять триходерон А та триходерон В, аспохалазини (*T. gamsii*), трихалазини [13, 25].

Протипухлинна дія вторинних метаболітів *Trichoderma spp.*

Деякі сесквітерпени є цитотоксичними щодо пухлинних клітин у культурі з IC50 (HeLa та MCF-7). Неомакрофорин I виявляв цитотоксичність відносно аденокарциноми людини (COLO 201) з IC50, харціанол I – відносно NCI-H1975 (IC50, 58,72 мМ), НерG2 (60,88 мМ) та MCF-7 (53,92 мМ), циклодепсипептиди – відносно HT-29, A549 та P388, з IC50, цитохалазани – відносно HeLa, циклопентенон – відносно A549, NCI-H460, MCF-7, MDA-MB-435, HeLa та DU-145 [25].

Більшу кількість вторинних метаболітів *Trichoderma spp.* та їх біологічну активність наведено у таблиці 2.

Вторинні метаболіти *Trichoderma spp.*

Сполука	Призначення	Продуцент
Трихоцин	Протигрибковий	<i>Trichoderma harzianum</i>
Трихорзин	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
6-пентил- α -пірон	Протигрибковий, антимікробний, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
6-пентил-2Н-піран-2-он	Протигрибковий, нематоцидний, регулятор росту томатів і <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Конінгінін А, В, Е	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Конінгінін D	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i>
Конінгінін С	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma koningii</i>
3,4-дигідроксикаротин	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
Лігнорен	Протигрибковий, антибактеріальний	<i>Trichoderma lignorum</i>

Триходермін	Протигрибковий, антитрихомонадний, мікотоксин	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma polysporum</i> , <i>Trichoderma sporulosum</i>
Мікотоксин Т2	Протигрибковий, мікотоксин	<i>Trichoderma lignorum</i>
Ергоконін А, В	Протигрибковий	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Вілідін	Антибіотик, інгібітор грибів, знищує спори, фітотоксин	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Дермадін	Антимікробний	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Гліовірін	Антимікробний	<i>Trichoderma virens</i>
Емодін	Антимікробний, протираковий	<i>Trichoderma viride</i>
Вірон	Інгібітор фосфатидилінозитол- 3-кінази	<i>Trichoderma virens</i>
Індол-3-оцтова кислота	Регулятор росту	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Індол-3- ацетальдегід	Ріст коренів	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Індол-3- карбоксальдегід	Утворення додаткових коренів	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Гліотоксин	Конкуренція за залізо в ризосфері	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma hamatum</i>
Циклонеродіол	Протигрибковий	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>

Триховірін II	Індукція стійкості огірків	<i>Trichoderma virens</i>
Аламетицин	Каналоутворюючий антибіотик, стійкість рослин	<i>Trichoderma viride</i>
Капроген В	Розчинення заліза недоступного для рослин	<i>Trichoderma spp.</i>
Гарціанова кислота	Антимікробний, регулятор росту рослин	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma arundinaceum</i>
β-мірцен	Регулює експресію генів (біотичні та абіотичні стреси)	<i>Trichoderma virens</i>
Абсцизова кислота	Регулює інтенсивність випаровування, газообмін	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Цереброзид А, D	Антибактеріальний	<i>Trichoderma saturnisporum</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Трихокаротин Е, Н	Альгіцидний	<i>Trichoderma virens</i>
Нафуредін	Антибактеріальний, альгіцидний	<i>Trichoderma citrinoviride</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Хромон	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
Трихокіндін I-VII	Біоіндуктор	<i>Trichoderma harzianum</i>
Тиросол	Протипухлинний	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma spirale</i>

1. 2. 1. Мовчазні метаболічні шляхи *Trichoderma spp.*

Секвенування геному мікроміцетів вказує, що більшість біосинтетичних кластерів генів, пов'язаних з вторинними метаболітами, є криптичними (транскрипційно мовчазними) або експресуються на дуже низьких рівнях у загальних лабораторних умовах. Ці результати свідчать про те, що мовчазні метаболічні шляхи є потенціалом синтезу нових речовин з невідомими функціями. Для активації криптичних біосинтетичних шляхів в останні роки було розроблено багато інноваційних підходів: внесення індукторів під час культивування (NaCl, NaBr, NaI), кокультивування, епігенетичне регулювання. Доведено, що зміна умов культивування може активувати криптичні метаболічні шляхи. Спільне культивування мікроорганізмів на основі міжвидової конкуренції є також ефективним шляхом стимулювання криптичних генів. Хімічна епігенетична корекція також довела свою ефективність як метод активації криптичних метаболічних шляхів. Її застосовано до морського штаму *T. harzianum* XS-20090075, щоб використати його потенціал для синтезу вторинних метаболітів. Інгібітор гістондеацетилази, Натрій бутират у концентрації 10 мМ, значно змінив метаболічний профіль штаму та призвів до появи трьох неописаних терпеноїдів: клейстантан, гарціановий дитерпеноїд та циклонерановий сесквітерпеноїд. Цікаво, що гарціанові дитерпеноїди були домінуючими метаболітами цього штаму за звичайних умов культивування. За впливу Натрію бутирату синтез гарціанів інгібовано. На противагу цьому, біосинтетичні шляхи клейстантанів та циклонеранів були успішно активовані, що призвело до виділення нового клейстантанового дитерпеноїду та серії циклонеранових сесквітерпеноїдів [12].

1. 3. Механізми біологічної дії мікроміцетів *Trichoderma spp.*

Мікробіологічні (біологічні) засоби контролю [1, 2, 4, 5, 10, 11, 14, 28-31], які зараз широко використовуються у сільському господарстві, можна класифікувати на два типи залежно від механізмів дії щодо збудників

захворювань рослин та взаємодії з рослинами. Групу, що визначається як «універсали», складають мікроорганізми родів: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, дріжджі, що здатні контролювати широкий спектр таксономічно різноманітних патогенів, застосовуючи різноманітні механізми біологічної дії [19]. Групу «спеціалістів» складають мікроорганізми родів: *Agrobacterium*, *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, непатогенні *Fusaria*, атоксигенні *Aspergillus* тощо, які можуть протидіяти лише одному або кільком цільовим патогенам. Механізмами біологічного контролю є прямий паразитизм або мікопаразитизм унаслідок фізичного проникнення, секреції численних літичних ензимів, антибіозу, конкуренції за поживні речовини або екологічні ніші. Класифікація ускладнюється, якщо враховувати опосередкований позитивний вплив мікроорганізмів на рослину. Опосередкована дія виявляється у індукуванні системної резистентності рослин до патогенів, стійкості до абіотичних стресів. Індукована системна резистентність активується молекулярними ефекторами/елісаторами, синтезованими мікроорганізмами (ензимами, протеїнами, вторинними метаболітами). Стійкість до абіотичних стресів (посуха, засоленість, нестача поживних речовин) виникають унаслідок взаємодії з ризобактеріями або деякими мікроміцетами-антагоністами, такими як *Trichoderma spp* [10, 11, 22, 24].

«Класичним механізмом» біологічного контролю, що притаманний *Trichoderma spp.*, є прямий антагонізм фітопатогенних грибів шляхом конкуренції, мікопаразитизму завдяки прямої атаки гідролітичними ензимами, антибіозу (рис. 2) [15, 16, 20, 24].

Конкуренція. *Trichoderma spp.* – це сапрофітні гриби зі швидким ростом міцелію та швидкою адаптивністю до навколишнього середовища, що дозволяє їм швидше колонізувати корені рослин, тканини рослин, ґрунт. Вони можуть захоплювати інвазивну частину патогенних грибів кореня рослини, тим самим перешкоджаючи їх проникненню у тканини рослин. Унаслідок швидкої колонізації субстратів, вони швидше мають доступ до поживних речовин,

необхідних для росту патогенних грибів. Це призводить до дефіциту поживних речовин у середовищі фітопатогена та пригнічує його ріст і розмноження [20, 22, 24].

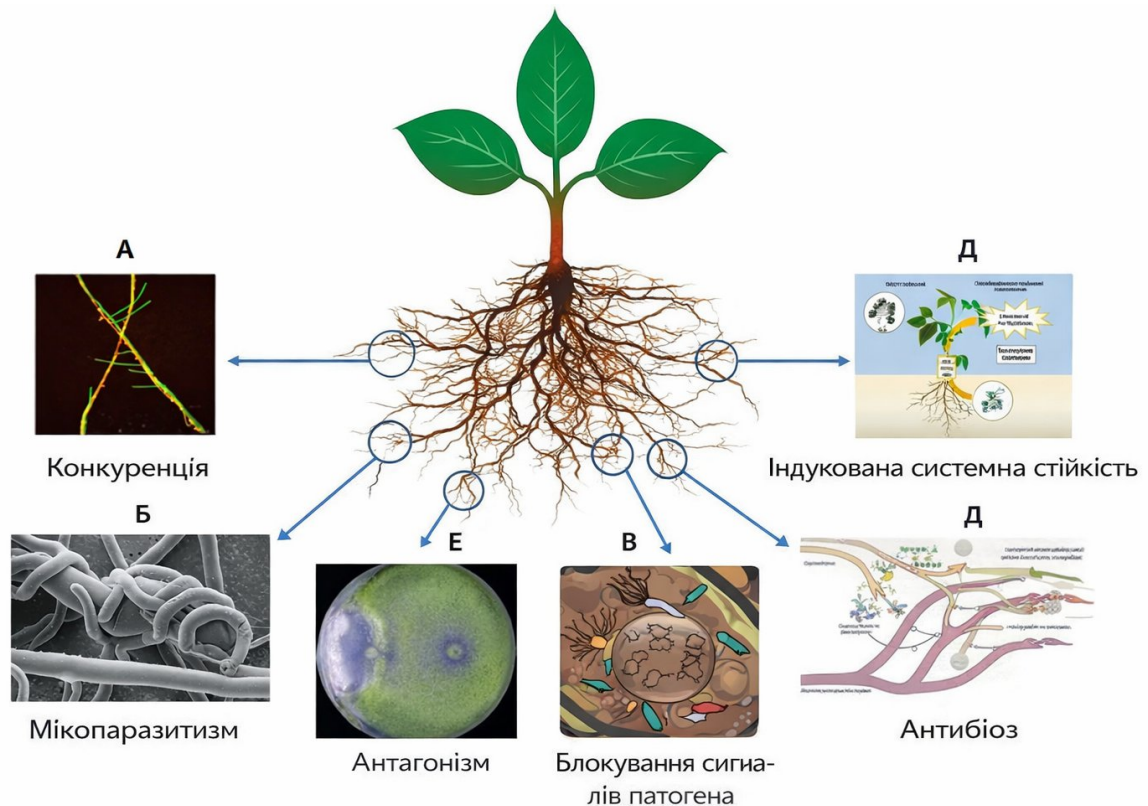


Рис. 2. Схема механізму дії *Trichoderma* щодо фітопатогенів

Під час **мікопаразитизму** відбувається безпосереднє проникнення гіфів *Trichoderma* у міцелій фітопатогена (рис. 3) або його пошкодження (рис. 4), що призводить до розширення, деформації, скорочення, округлення клітин, зменшення протоплазми та руйнування клітинної стінки. Руйнування клітинної стінки патогенних грибів відбувається за рахунок синтезу триходермою ензимів, що руйнують хітин, задля проникнення всередину клітини. *T. koningiopsis* може проникати у гіфи *Sclerotinia sclerotiorum*, прикріплюючись до них, обвиваючись навколо них, призводячи до деградації. Міцелій *Trichoderma* гіперпаразитовав *Fusarium graminearum* шляхом адгезії, звивання, проникнення у клітину та інших механізмів, що призводить до деформації та зрештою руйнування міцелію патогена. Хітиназа, що секретується *T. harzianum*, відіграє

важливу роль у деградуванні клітинної стінки, аутолізу міцелію, пригніченні проростання спор, росту міцелію та утворення спор [20, 22, 24].

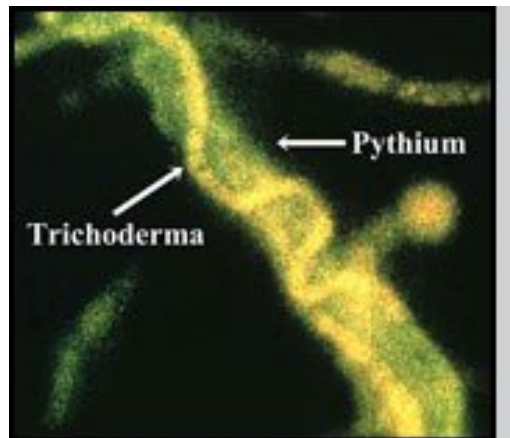


Рис. 3. Мікопаразитизм штаму *Trichoderma* на рослинному патогені (*Pythium*), яким інфіковано поверхню насіння гороху. Штам *Trichoderma* забарвлювали помаранчевим флуоресцентним барвником, тоді як *Pythium* зеленим (Hubbard et al., 1983. Phytopathology 73:655-659)

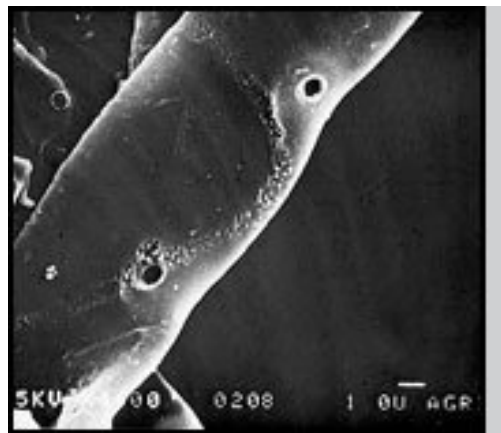


Рис. 4. Поверхня гіфа рослинного патогена *Rhizoctonia solani*, скануюча електронна мікроскопія, після видалення гіфів мікопаразита *Trichoderma*. Помітні руйнування клітинної стінки внаслідок активності ензимів, а також отвори, через які гіфи *Trichoderma* проникли в *R. solani* (<https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.php>).

Антибіотичний ефект (антибіоз). Антибіотичний ефект головним чином стосується здатності *Trichoderma spp.* пригнічувати ріст фітопатогенних грибів шляхом виділення антифунгальних вторинних метаболітів. Серед антифунгальних вторинних метаболітів трихоміцин, желатиноміцин, хлоротрихоміцин, також синтезують антибактеріальні пептиди. Ці вторинні метаболіти водночас сприяють росту рослин. Леткі вторинні метаболіти, що

виділяються *T. viride* TG050 609, можуть спричиняти нерівномірний ріст, руйнування міцелію *P. nicotianae* [20, 22, 24].

Деякі дослідження демонструють, що окремі види *Trichoderma* можуть синтезувати леткі метаболіти, які пригнічують ріст колоній фітопатогенів на 80%.

Ізоляти *Trichoderma* дієві проти широкого спектру мікопатогенів [19], серед яких:

- ~ *Botrytis cinerea*;
- ~ *Rhizoctonia solani*;
- ~ *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium spp.*;
- ~ *Pythium ultimum*;
- ~ *Phytophthora spp.*;
- ~ *Armillaria spp.*;
- ~ *Fusarium oxysporum*;
- ~ *Verticillium spp.*;
- ~ *Gaeumannomyces graminis*.

Види *Trichoderma*, що найчастіше використовуються як біоконтролюючі агенти, є у складі біопрепаратів:

- ~ *T. harzianum*;
- ~ *T. atroviride*;
- ~ *T. asperellum*;
- ~ *T. polysporum*;
- ~ *T. viride*.

T. viride та *T. harzianum* мають різний ступінь інгібуючої дії щодо 29-ти видів фітопатогенних грибів, що належать до 18-ти родів [24]. Порівняння біологічної дії різних видів *Trichoderma* наведено у таблиці 3.

Порівняння біологічної дії різних видів *Trichoderma*

Назва виду	Основна функція
<i>T. harzianum</i>	Індукована системна стійкість до фітопатогенів, нематод; Покращення росту рослин і кореневої системи
<i>T. asperellum</i>	Антифунгальна активність; стимулювання росту рослин; стійкість до стресів; підвищення родючості ґрунту
<i>T. asperelloides</i>	Протигрибкова активність; Стимулювання росту рослин; Стійкість до стресів
<i>T. atroviride</i>	Фунгістатична активність; стимулювання росту рослин; антифунгальна та антибактеріальна активність; покращення засвоєння поживних речовин рослиною; індуковані системні захисні реакції рослин; стійкість до стресів
<i>T. hamatum</i>	Стійкість до нематод; антибактеріальна та антифунгальна активність; стимулювання росту рослин
<i>T. virens</i>	Антифунгальна активність; стимулювання росту рослин
<i>T. viride</i>	Антифунгальна активність; посилений розвиток кореневої системи; стійкість до нематод; стійкість до стресів
<i>T. longibrachiatum</i>	Антифунгальна активність; підвищення солестійкості; стійкість до нематод; стимуляція росту рослин; індукування системної стійкості рослин
<i>T. ghanense</i>	Стимуляція росту рослин; підвищення родючості ґрунту
<i>T. tomentosum</i>	Стимуляція росту рослин; підвищення родючості ґрунту
<i>T. volatiles</i>	Індукована системна стійкість рослин
<i>T. velutinum</i>	Стимулювання росту рослин
<i>T. phayaoense</i>	Антифунгальна активність; покращення росту рослин і кореневої системи
<i>T. koningiopsis</i>	Антифунгальна активність; стимулювання росту рослин
<i>T. citrinoviride</i>	Антифунгальна активність; стійкість до нематод
<i>T. reesei</i>	Антифунгальна активність
<i>T. gamsii</i>	Антифунгальна активність; вплив на поведінку живлення трав'янистих
<i>T. atrobrunneum</i>	Стійкість до нематод
<i>T. afroharzianum</i>	Стимулювання росту рослин
<i>T. bissettii</i>	Антифунгальна активність
<i>T. parareesei</i>	Вплив на ріст і розвиток рослин
<i>T. aggressivum</i>	Біологічний контроль фітопатогенів
<i>T. lignorum</i>	Стійкість до нематод
<i>T. taxi</i>	Антифунгальна активність
<i>T. strigosellum</i>	Стійкість до нематод; стимулювання росту рослин

<i>T. hebeiensis</i>	Антифунгальна активність; стимулювання росту рослин
<i>T. erinaceum</i>	Антифунгальна активність; стимулювання росту рослин

Препарати на основі *Trichoderma* ефективні проти поширення захворювань перцю, зокрема в'янення перцю. Ефективність сягала до 54,8%, що на 12,5% вище, ніж ефективність хімічного пестициду карбендазиму. *T. harzianum* володіє інгібувальною дією проти фітофтори перцю та картоплі. Може пригнічувати ріст фітофтори у ґрунті, зменшувати кількість патогенних грибів та знижувати показник частоти загибелі розсади. Ефективним є рідкий препарат з *T. asperellum* проти раку яблуні (показник досяг 88,24%, що значно вище, ніж аналогічний для бензізотіазолінону. Активність *T. asperellum* щодо різних мікопатогенів різна: найкраще вона проявляється щодо знищення збудника плямистості листя кукурудзи (до 77,91%); гірше діє проти *Pythium* та *Fusarium*; найгірший інгібуючий ефект – фітофтороз кукурудзи. Триходерма широко використовується для біологічного контролю вертицильозного в'янення бавовни, сірої гнилі сільськогосподарських культур, сірої гнилі томатів, в'янення дині, сухої гнилі картоплі, кореневої гнилі тютюну та інших захворювань рослин [24].

Біологічною дією *Trichoderma* щодо рослин є стимулювання росту (рис. 5), розвитку та врожайності. Зокрема, такий результат отримано у роботах, які вивчали вплив *Trichoderma* на ріст коренів, надземний вегетативний ріст за показниками довжини та товщини стебла, величини листя, вмісту хлорофілу, розміру та/або кількості квітів та/або плодів. Такі результати отримано унаслідок синтезу *Trichoderma* сидерофорів, фітогормонів, що мають вплив на ріст рослин, стимулюють дихання, активуючи фотосинтез або фотосинтетичну ефективність, а також підвищуючи здатність рослини витримувати абіотичні стреси, такі як посуха, засоленість, висока температура. Значно пізніше вивчено синтез *Trichoderma* антимікробних сполук вторинного метаболізму, які також позитивно впливають на рослину в аспектах стимулювання росту, збільшення врожайності, інтенсифікації антиоксидантних реакцій [24].

Trichoderma може синтезувати стимулятори росту, такі як індолілоцтова кислота та харціанолід, які сприяють розвитку та росту коренів рослин шляхом

секреції фітази та феритину, що у свою чергу покращує поглинання Фосфору та Феруму рослинами, покращує фотосинтетичну ефективність рослин. Ензими *Trichoderma* деградують складні органічні речовини ґрунту, забезпечуючи доступність поживних речовин для рослин [22, 24].

Також досліджено, що *Trichoderma* під час взаємодії з рослинами також може відігравати вирішальну роль у стимулюванні синтезу летких рослинних сполук, які впливають на взаємодію рослин і комах. Крім того, штами *Trichoderma* можуть бути агресивними біодеградаторами компосту та виступати конкурентами сапрофітних мікопатогенів, особливо коли поживні речовини є лімітуючим фактором. Вивчається їх потенціал у біо- та фітобіоре mediaції токсичних сполук шляхом деградування ксенобіотиків ґрунту (рис. 5) [22, 24].

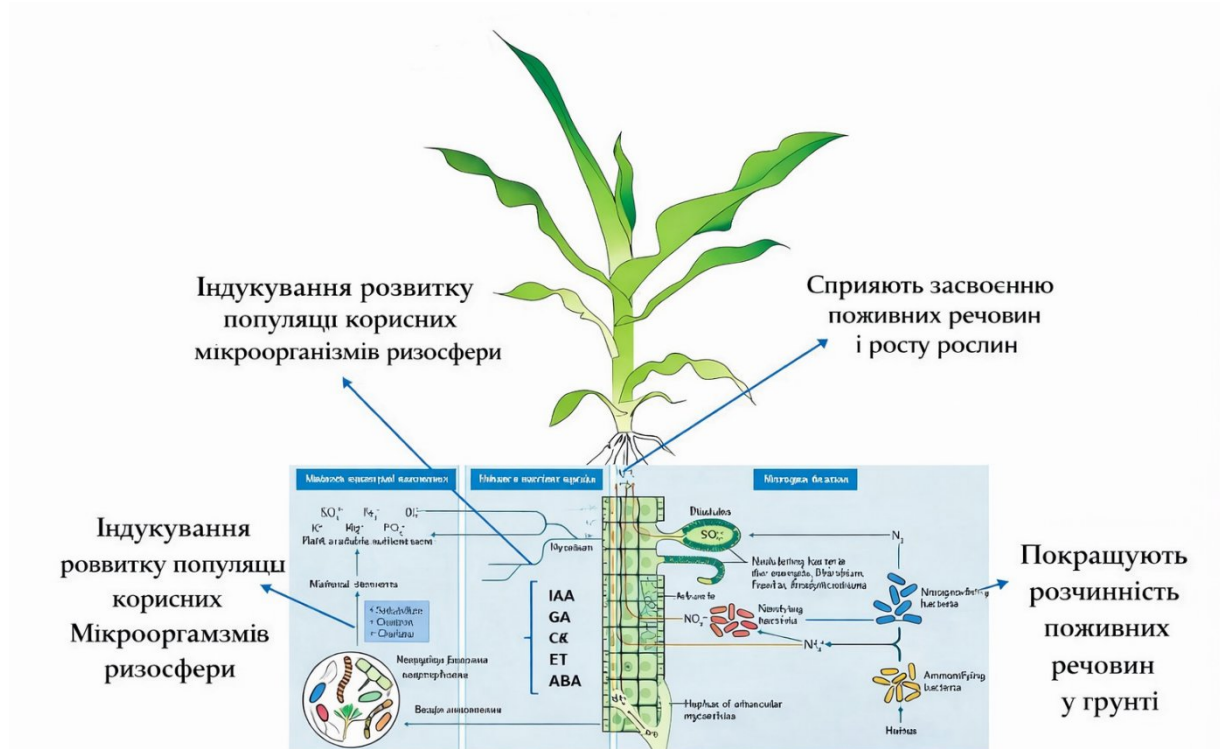


Рис. 5. Механізми стимулювання росту рослин представниками роду *Trichoderma* та відновлення навколишнього середовища

1. 3. 1. Індукування системної стійкості рослин представниками *Trichoderma* та їх нематоцидна дія.

Триходерма здатна системно активувати захисні механізми рослин (рис. 5). У індукуванні системної стійкості рослин переважно задіяно шляхи передачі

сигналів, такі як шляхи саліцилової кислоти (SA), жасмонової кислоти (JA) та етилену (ET). Еліситори *Trichoderma*, розпізнаються рослинами, активують шляхи передачі сигналу і як наслідок індукується системна резистентність рослин. Мікробіологічні детермінанти, що розпізнаються рослинами, називаються молекулярними патернами, пов'язаними з мікроорганізмами (MAMP). Після колонізації триходермою коренів рослин, вивільняються різноманітні MAMP для активації імунної відповіді. Фактично ці механізми зараз вважаються таким, що відіграють значну роль у захисті врожаю порівняно з прямим антагонізмом фітопатогенів. Це явище широко спостерігається у різноманітних Однодольних та Дводольних культур, включаючи Злакові, Пасльонові та Гарбузові, які часто уражаються мікопатогенами (*R. solani*, *B. cinerea*, *Colletotrichum spp.*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.* тощо), патогенними бактеріями (*Xanthomonas spp.*, *Pseudomonas syringae* тощо), а також вірусами (вірус мозаїки огірків) [22, 24].

Trichoderma spp. застосовують проти нематод (рис. 5). Механізм, за допомогою якого пригнічується розвиток нематод, залишається до кінця незрозумілим. Гіфи *Trichoderma* проростають через оболонки яєць або кутикулу личинок, дорослих особин, колонізують тіло, поглинають поживні речовини та спричиняють загибель нематод.

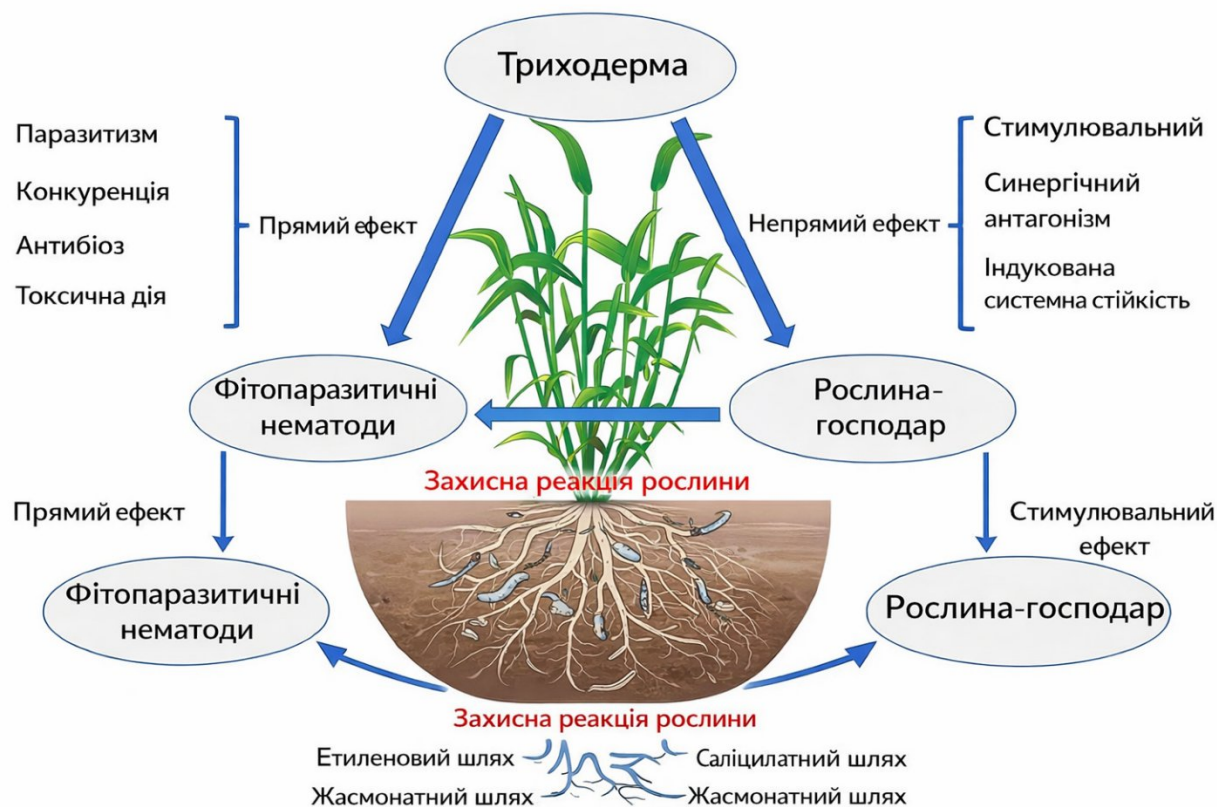


Рис. 5. Схема механізму дії *Trichoderma* у боротьбі з нематодами та індукування системної стійкості рослин

Деякі дослідження показують, що серинова протеаза pr1 *Trichoderma* схожа за біохімічними особливостями до протеїну Pr1 нематоцидних мікроміцетів. Відповідно до порівняльного аналізу цих сполук у різних мікроміцетів, роблять висновок про механізм дії триходерми проти нематод. Антимікробні пептиди володіють нематоцидною дією. Антимікробна, антинематодна активність водночас супроводжується індукуванням активності β -1,3-глюканази, хітинази та протеази *Trichoderma*, що формує стійкість рослин до нематод [24].

Останнім часом розробляється четверте покоління засобів захисту. Власне, до складу цих препаратів входять речовини, дія яких спрямована не на знищення фітопатогенів, а на зниження їхньої патогенності та підвищення захисних властивостей рослин. Їх називають еліситорами або індукторами системної стійкості рослин. Це речовини біотичної та абіотичної природи (ендогенні або екзогенні відносно рослин), які розпізнаються рослинами як сигнали небезпеки та у відповідь на які культура запускає свої захисні

механізми, здатні знизити наслідки біотичних та абіотичних стресів. Еліситори, після їх розпізнавання рослинами, запускають сигнальні системи, що призводять до експресії генів, пов'язаних із системою захисту [1, 2, 27].

Усі вище зазначені біологічні особливості розширюють сферу потенційного застосування біопрепаратів на основі *Trichoderma* для сільського господарства не лише як біофунгіцидів, але й як загальний біоінокулянт, що стимулює стійкість рослин до біотичних та/або абіотичних стресів, посилює ріст рослин та врожайність, а також покращує агроєкосистему. Більше того, перспективне використання біосполук на основі *Trichoderma* не обмежується лише сільським господарством, але також може бути поширене на застосування в інших галузях наук про Землю та життя, таких як екологія довкілля, медицина або стоматологія (антимікробна активність) [27-31].

Висновок

Універсальність та широкий спектр біологічних механізмів дії *Trichoderma spp.* пов'язують з швидкою адаптацією до різних екологічних умов існування, а також високою еволюційно сформованою здатністю до симбіотичних та синергічних зв'язків з іншими організмами. Крім того, ці мікроміцети синергічно взаємодіють з багатьма хімічними пестицидами та природними сполуками, що дозволяє зменшити дози пестицидів, які зазвичай використовуються у польових умовах.

Біологічні механізми і потенціал представників роду *Trichoderma* як агентів біоконтролю:

- ~ здатність до мікопаразитизму та/або синтезу літичних ензимів;
- ~ індукування системної стійкості рослин до біотичних та абіотичних стресів;
- ~ стимулювання росту та розвитку рослин/коренів, врожайності;
- ~ здатність колонізувати ризосферу, бути ендofітними;
- ~ продукування вторинних метаболітів, які володіють негативним впливом щодо фітопатогенів та позитивним щодо рослин;
- ~ деградування ксенобіотиків ґрунту;

- ~ здатність до солюбілізації, переведення поживних речовини у доступні форми для засвоєння рослинами;
- ~ здатність бути сумісними або синергетичними з агрохімічними препаратами та іншими агентами біоконтролю;
- ~ залишатись біологічно активними (продукувати спори/КУО) після застосування умов промислової ферментації як стадії одержання біопрепарату.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Роботу виконано у лабораторії кафедри біотехнології та радіології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького.

2. 1. Матеріали дослідження

2. 1. 1. Біопрепарат.

Триходермін (Віридин) – спори та міцелій грибів роду *Trichoderma spp.* з титром не менше 1×10^8 КУО/мл (рідка форма) та 5×10^8 КУО/см³ (суха форма) та продукти метаболізму – біологічно активні речовини. Виробник: ENZIM Agro – це український бренд біологічних засобів захисту та стимулювання росту рослин, які виробляються за сучасними технологіями заводом «ЕНЗИМ» (м. Ладизин, Україна) для забезпечення потреб під час вирощування сільськогосподарських, овочевих, плодово-ягідних та декоративних культур, а також для органічного землеробства [7].

Приготування суспензії мікроорганізмів, які входять до складу біопрепарату.

Для приготування суспензії мікроорганізмів для посіву у стерильний епендорф (1500 мкл) внесли 1 г комерційного препарату Віридин (Ензим) і ресуспендували у 1000 мкл дистильованої стерильної води.

2. 1. 2. Середовище Чапека.

Для культивування та виділення чистої культури *Trichoderma spp.* обрано живильне середовище Чапека (табл. 4). Ми його модифікували, додавши CaCl_2 , що на нашу думку, сприятиме кращому, розвитку, спороношенню мікроміцетів. Загалом це середовище багате для мікроорганізмів на різні мікро-, макроелементи, необхідні для їх життєдіяльності. Середовище містить буферну систему, для нейтралізування сторонніх продуктів метаболізму. рН середовища 5,5. Середовище стерилізували. Середовище Чапека прозоре, що забезпечувало інформативність результатів. Загалом середовище Чапека напівсинтетичне, для культивування мікроміцетів та деяких видів бактерій, у якому Натрію нітрат виконує функцію єдиного джерела неорганічного Нітрогену, тому воно є селективним, адже відсутність органічних нітрогеновмісних сполук пригнічує ріст бактерій, та створює оптимальні умови для росту та розвитку мікроміцетів, і є доцільним для використання у даному дослідженні. Джерелом Карбону та енергетичним субстратом є глюкоза.

Таблиця 4

Склад модифікованого середовища Чапека

Компоненти	Концентрація г/л
KH_2PO_4	1
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
NaNO_3	2
Глюкоза	20
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,5
CaCl_2	0,1
Агар-агар	20

Приготування твердого живильного середовища Чапека.

На вагах відважували усі інгредієнти середовища. До колби на 1 л вносили відважені неорганічні речовини і поступово розчиняли їх у дистильованій воді. Після внесення неорганічних сполук, вносили органічні:

глюкозу та агар-агар. Отриману суміш ретельно перемішували, нагрівали та доводили до повного розчинення компонентів, дистильованою водою доводили кількість розчину до 1 л. Для досягнення найоптимальніших показників росту та розвитку культури важливо стабілізувати кислотно-лужний баланс до 5,5. Стерилізацію проводили в автоклаві, під дією вологого жару за температури 121°C та тиску 1 атм упродовж 20 хвилин. Чашки Петрі попередньо стерилізували сухим жаром 1 годину за температури 170°C і розливали середовище так, щоб об'єм займав приблизно одну третину посудини.

Приготування рідкого живильного середовища Чапека.

Рідке живильне середовище готували аналогічно до твердого, без агар-агару. Розливали у попередньо стерилізовані колби з ватно-марлевими корками на 250 мл по 100мл.

2. 1. 3. Зерновий субстрат

Як зерновий субстрат для нарощення біомаси мікроміцетів роду *Trichoderma spp.* використовували рис.

Приготування зернового субстрату для культивування мікроміцетів роду *Trichoderma spp.*

На дно колби з ватно-марлевими корками на 250 мл вносили зерна рису і автоклаували під дією вологого жару за температури 121°C та тиску 1 атм упродовж 30 хвилин.

2. 2. Методи дослідження

2. 2. 1. Одержання чистої культури мікроміцетів роду *Trichoderma*.

Частину експерименту, яка потребує стерильності виконували у Кабінеті біологічної безпеки II класу (Streamline SC2-4S1, Esco (Сінгапур) або на стерильній поверхні під полум'ям пальника.

Для виділення чистої культури та культивування *Trichoderma spp.* з біопрепарату, висівали суспензію мікроорганізмів на тверде живильне середовище методом газону. Культивували у термостаті за температури 28°C сім діб у термостаті лабораторному ТС-80. На третій день відбирали окремі колонії, які за морфолого-культуральними ознаками відповідали *Trichoderma spp.* і пересівали методом штриха на свіже тверде живильне середовище. Культивували у термостаті за температури 28°C сім діб, візуально контролюючи появу ознак контамінування. Дослід проводився у трьох паралелях, поряд з експериментальними чашками Петрі ставили контрольні.

2. 2. 2. Одержання глибинної культури мікроміцетів роду *Trichoderma*.

Частину експерименту, яка потребує стерильності виконували у Кабінеті біологічної безпеки II класу (Streamline SC2-4S1, Esco (Сінгапур) або на стерильній поверхні під полум'ям пальника.

Нарощення маси для інокулювання зернової культури відбувалось за глибинного культивування, у рідкій культурі. Інокулят готували, зробивши посів у колбу з рідким живильним середовищем. Для того, поверхню чистої культури *Trichoderma* зі спорами на 7-му добу культивування змочували. Відбирали 1 мл суспензії спор та вносили до колби з рідким середовищем. Культивували у орбітальному шейкері-інкубаторі ES-20 (BioSan, Латвія) за температури 28°C, 250 об/хв сім діб, візуально контролюючи появу ознак контамінування. Для перевірки на забруднення ферментаційний бульйон висівали на агарові пластини, інкубували за 30°C упродовж 48 годин, і візуально перевіряли ознаки контамінування. Дослід проводився у трьох паралелях, поряд з експериментальними колбами ставили контрольні.

2. 2. 3. Мікроскопування мікроорганізмів.

Мікроскопування відбувалось за прямопольного способу. Мікроскоп Axiolab. A1 FL Zeiss, Німеччина. Для оцінювання та ідентифікації *Trichoderma*

spp. використовували загальноприйняті у мікробіології методи. *Trichoderma spp.* ідентифікували за допомогою визначника Берджі та методом фарбування зразків колоній: фарбування клітин за Грамом. Досліджено морфологічні ознаки мікроміцетів, їх спорангіїв та спор, та просторового розташування клітин.

2. 2. 4. Культивування мікроміцетів роду *Trichoderma* на зерновому субстраті.

Підготований рис інокулювали 7-ми добовим інокулятом. Для того 10 мл рідкої культури *Trichoderma* вносили у колбу з рисом, закорковували ватно-марлевими корками та інкубували за температури 28°C у термостаті лабораторному ТС-80, візуально контролюючи появу ознак контамінування. Дослід проводився у трьох паралелях, поряд з експериментальними колбами ставили контрольні.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3. 1. Узагальнення наукових даних щодо біологічних особливостей *Trichoderma spp.* Вивчення механізмів біологічної дії *Trichoderma spp.* як агента біоконтролю

Представники роду *Trichoderma* мають багато переваг у своєму середовищі існування. Вони швидкі колонізатори ґрунту, ризосфери, це ендofітні мікроміцети. Біологічно активні сполуки *Trichoderma spp.*, завдяки яким вони активні проти фітопатогенів, : трихоміцин, гліотоксин, віридин, антибактеріальний пептид, β -1,3-глюканаза, хітиназа, поліпептиди, полікетони, бутиролактони, сесквітерпенова гептадекарбонова кислота, терпени та деякі леткі речовини (вуглеводні, спирти, фурани, альдегіди, алкани, олефіни, естери, ароматичні сполуки, гетероциклічні сполуки та різні терпеноїди). Механізмами біологічної дії *Trichoderma spp.* як агента біоконтролю є конкуренція, мікопаразитизм, антибіоз.

Потенціал антагоністів є основою для ефективного застосування різних штамів *Trichoderma* у біологічному контролі як біофунгіцидів проти ґрунтових, листяних та судинних фітопатогенів, як альтернативи хімічним пестицидам, а також для підвищення стійкості до абіотичних стресів. Донедавна вважалося, що вплив представників роду *Trichoderma* щодо рослин обмежується контролем фітопатогенів. Пригнічуючи ріст і розмноження фітопатогенів, *Trichoderma* може стимулювати рослин-господарів до реакцій захисту та формування системної стійкості до захворювань. Індукована триходермою стійкість рослин досягається двома шляхами: за допомогою еліситорів або синтезуючи ензими та олігоцукори – індуктори стійкості. Наразі існує понад 20 еліситорів, що продукуються *Trichoderma*: поліпептиди, ліпопептиди, целюлази, гідрофобні протеїни, терпеноїди, фенольні похідні, глікозидні ліганди та флавоноїди.

Наприклад, понад 10 еліситорів *Trichoderma*: Sm1, гідрофобний протеїн QID74, ензим, що розщеплює хітин, MRSP1, ксиланазу, целюлазу, ендополігалактуроназу, сахаразу та антибактеріальні пептиди ізолювано з п'яти видів *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride* та *T. harzianum*. Деякі дослідження показують, що серинова протеаза pr1 *Trichoderma* схожа за біохімічними особливостями до протеїну Pr1 нематоцидних мікроміцетів. Відповідно до порівняльного аналізу цих сполук у різних мікроміцетів, робимо висновок про механізм дії триходерми проти нематод. Антимікробні пептиди володіють нематоцидною дією. Антимікробна, антинематодна активність водночас супроводжується індукуванням активності β -1,3-глюканази, хітинази та протеази *Trichoderma*, що формує стійкість рослин до нематод [24].

3. 2. Виділення *Trichoderma* spp., отримання чистої культури та культивування на живильних середовищах, аналіз морфолого-культуральних ознак

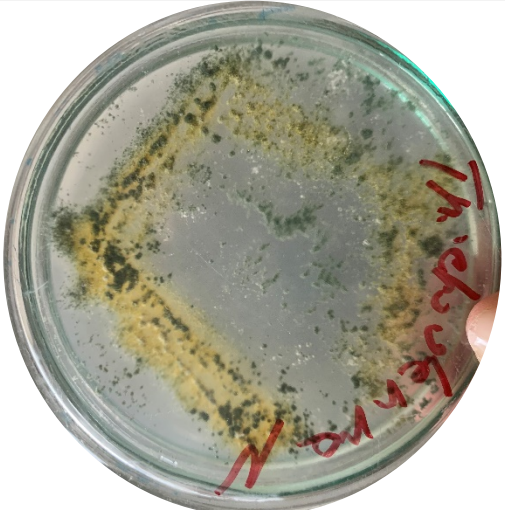
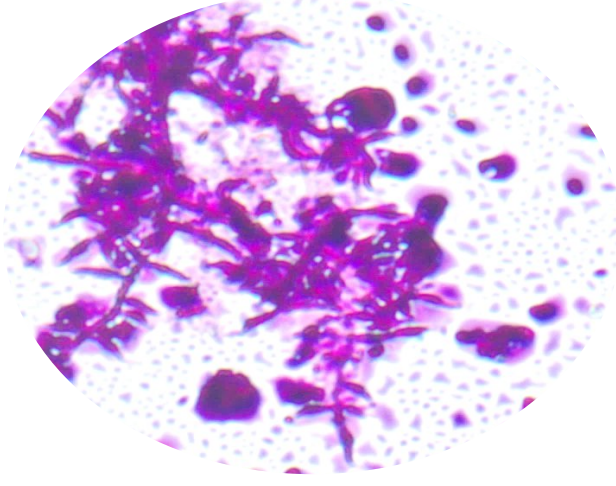
Висіяну суспензію мікроорганізмів біопрепарату Триходермін культивували на твердому живильному середовищі за температури 28°C упродовж 7-ми діб. Візуалізували колонії вже на 3 добу (рис. 6), тоді як повний розвиток культуральних ознак – на 5 добу інкубації. Інтенсивність забарвлення колоній корелює зі ступенем спороутворення. Задля отримання чистої культури, робили посіви методом штриха окремих колоній, які за культуральними ознаками відповідали представникам роду *Trichoderma spp.*

Колонії представників роду *Trichoderma* характеризуються варіабельністю забарвлення в межах жовто-зеленого спектру. За відсутності інгібуючих чинників колонії демонструють інтенсивний радіальний ріст і здатні повністю колонізувати поверхню живильного середовища, формуючи суцільний міцеліальний покрив (рис. 6). Макроморфологічно колонії непрозорі, з характерною пухкою консистенцією та добре вираженою міцеліальною структурою. Край колоній, як правило, рівний, проте в окремих випадках може набувати слабо хвилястої форми.

Колонії роду *Trichoderma* на середовищі Чапека характеризувалися швидким ростом, округлою формою та чітко окресленими межами. На ранніх стадіях розвитку колонії мали світле забарвлення, яке за культивування трансформувалося у характерні жовто-зелені відтінки (жовтий, світло-зелений, оливковий) внаслідок активного утворення конідій (рис. 7).

Реверс колоній жовтого кольору, без вираженої дифузії пігментів у живильне середовище.

Мікроскопічне дослідження підтвердило наявність типових для роду *Trichoderma* морфологічних структур (за визначником Берджі). Вегетативні гіфи септовані, з інтенсивним розгалуженням (рис. 8, 9). Конідієносці розгалужені. Конідії мають округлу або еліпсоїдну форму, з гладкою поверхнею.

	
Рис. 6. Посів комерційного біопрепарату Віридин (3 доба). Середовище Чапека у модифікації.	Рис. 7. Колонії роду <i>Trichoderma</i> (3 доба), чиста культура. Посів здійснювався методом штриха. Середовище Чапека у модифікації.
	
Рис. 8. Конідієносці <i>Trichoderma</i>, система галуження типу «ялини», 50 мкм	Рис. 9. Конідієносці <i>Trichoderma</i>, фарбування за Грамом, 50 мкм

Верхівка конідієносця закінчується фіолідами – кеглеподібними або пляшкоподібними гілками. Конідії утворюються на фіалідах по одній.

На підставі сукупності культуральних ознак та мікроскопування (морфологія конідій, конідієносців) досліджуваний взірець мікроорганізмів обґрунтовано віднесено до роду *Trichoderma*.

Після отримання чистої культури *Trichoderma* spp., на 7-му добу культивування у термостаті на твердому середовищі відбувався пересів у рідке середовище. Для того поверхню чистої культури *Trichoderma* зі спорами на 7-

му добу культивування змочували. Відбирали 1 мл суспензії спор та вносили до колби з рідким середовищем. Після семи діб культивування інокулятом (рідка культура) інокулювали зерно, приготоване для отримання зернової культури *Trichoderma spp* (рис. 10, 11).



Рис. 10. Інокульовані *Trichoderma spp.* зерновий субстрат (рисові зерна) у колбі

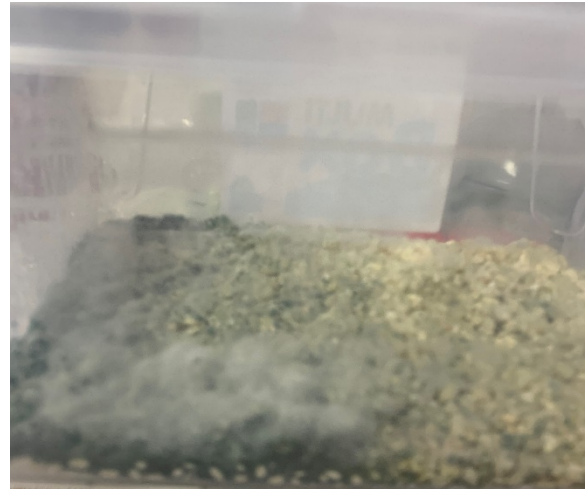


Рис. 11. Культивування мікроміцетів роду *Trichoderma* на зерновому субстраті

Як субстрат використовували зерно рису, який зволожували, стерилізували та інкубували з триходермою від 10 до 15 днів. у результаті чого з'явилося темно-зелене спорове покриття на насінні. Ці зерна можна подрібнити і використовувати для обробки насіння або збагачення ґрунту.

Отже, ми отримали чисту культуру *Trichoderma spp.* з біопрепарату Триходермін, ідентифікували об'єкт, який нас цікавив, оптимізували умови його культивування, опрацювали біотехнологію одержання різних типів культур мікроміцетів.

3. 3. Опрацювання біотехнології створення засобів захисту рослин на основі *Trichoderma spp.*

Кількість біопродуктів, що містять *Trichoderma* на міжнародному ринку, експоненціально зростає за останні 5 років, і зараз доступно понад 250 продуктів. Біологічні препарати *Trichoderma* широко поширені в усіх географічних регіонах світу. Продукти *Trichoderma* рекламують як

біопестициди, біофунгіциди, біопротектори, біоінокулянти, біостимулятори, біодекомпозитори, біодобрива, стимулятори росту рослин тощо. Більшість продуктів, що містять *Trichoderma* на ринку, претендують на роль фунгіцидів (64,8%). Багато таких засобів захисту рослин схвалені для використання в органічному землеробстві у різних країнах.

Більшість препаратів *Trichoderma* продаються у вигляді змочуваного порошку, що містить певну концентрацію висушених спор конідій грибів, який змішується з водою. Є особливий порошковий препарат, який доставляється до рослин за допомогою бджіл. Поширеними є рідкі, а також гранульовані, тверді форми препаратів, що включають такі субстрати, як кокосовий килим або торф, зерна злаків, такі як рис, або подрібнена кукурудза, що підтримують ріст культури *Trichoderma* до утворення спор. Унікальна система використовує штифти, просочені *Trichoderma*, для вставки в отвори, просверлені в дереві або стовбурі виноградної лози, забезпечуючи системний захист у відповідь на стрес рослини упродовж 4-ох -5-ти років. Іншими продуктами є емульсії, концентровані рідкі суспензії, тальки. Препарати для обробки рослин: гранули, емульсії, суспензії *Trichoderma* додаються до води та змішуються для застосування, такого як обприскування (наземне та повітряне), кореневе поливання, занурення, обробка насіння, зрошення, гідропоніка; тоді як гранули, сухі, рідкі та тверді препарати готові до використання та вносяться безпосередньо, наприклад, у ґрунт шляхом змішування під час посіву або пересадки.

Спори мікроміцетів ми отримали у твердому стані ферментацією на стерильному рисі, можна використовувати також кукурудзу або інші зернові. У висушеному стані субстрату, колонізований *Trichoderma*, можна наносити безпосередньо на посіви або ґрунт. Спори можна відокремлювати від насіннєвої основи шляхом просіювання та ресуспендування у воді.

Іншим метод, який ми теж опрацювали, – *Trichoderma* у рідкому середовищі. За допомогою такого методу отримують культуру, що містить

спори, міцелій, літичні ензими, метаболіти тощо, і цю суміш мікроміцетів безпосередньо застосовують у полі для біологічного контролю.

Останнім етапом роботи є сушіння зернової культури і отримання порошку спор, міцелію та зернового субстрату.



Рис. 12. Біотехнологія одержання біопрепарату на основі *Trichoderma* spp.

Комерційне застосування біопрепаратів на основі *Trichoderma* значною мірою залежить від його стійкості до високих температур, сушіння, ультрафіолетове випромінювання, стійкості до зберігання (більше 1 року за нормальної температури). Наразі існують дві основні технології: з одного боку, зниження кислотності та регулювання використання Оксигену для стимулювання триходерми до утворення стресостійких хламідоспор; з іншого боку, до препарату додаються деякі хімічні добавки (на основі Купруму). Стійкість *Trichoderma* до високої температури (35~40°C) та ультрафіолетового випромінювання досягають додаючи до складу трегалозу. Внесення гліцерину до складу препарату *Trichoderma* як зволожувача, продовжує термін його зберігання. Застосувавши додаткові умови вказані вище, спеціальний дизайн

упаковки, вакуумне сушіння та пакувальні матеріали з поліетилену низької щільності можуть подовжити термін придатності біопрепарату до 15 місяців.

Перспективи та рекомендації до вдосконалення біотехнології одержання біопрепаратів.

Щоб бути економічно конкурентоздатними на комерційному ринку, а також еквівалентним або такими, що перевершують за ефективністю хімічні продукти, необхідно надалі розробляти нові способи культивування, форми препаратів, рецептури з *Trichoderma*. У свій час витрати на промислове виробництво були суттєво знижені завдяки використанню вдосконалених твердих або рідких процесів ферментації. Для отримання чистих мікоспор *Trichoderma* використовуються недорогі субстрати. Наприклад, зернові, такі як рис, або відходи харчової промисловості (після отримання борошна, волокна рослин після отримання олії, фруктові шкірки тощо). Цей процес не потребує дорогого високотехнологічного обладнання, висококваліфікованих працівників. Всі вище зазначені умови дозволяють здешевити виробництво біопрепарату, при цьому не втрачаючи його ефективності, підтримувати конкурентоздатність на комерційному ринку.

ВИСНОВКИ

1. За інтенсивного сільськогосподарського виробництва, використання хімічних пестицидів спричинило серйозне забруднення навколишнього середовища та підвищило стійкість патогенів до хімічних пестицидів. Аналізуючи сучасні наукові джерела літератури, беззаперечним є факт того, що *Trichoderma spp.* має хороший біологічний контрольний ефект і може зменшити використання хімічних пестицидів, тому може бути альтернативою хімічним засобам захисту рослин. На ринку все ще є мало засобів біоконтролю, тому роботи у цьому керунку є актуальними. Важливим у розвитку біопрепаратів є віднайдення та створення ефективних штамів *Trichoderma* (стійких до хімічних пестицидів та низьких температур з подовженим терміном зберігання) за допомогою технологій генної інженерії, тому пришвидшити досягнення результату можуть дослідження на рівні геному, протеому та метаболому.
2. Отримали чисту культуру *Trichoderma spp.*, ідентифікували методами мікроскопії та за морфолого-культуральними ознаками. Колонії швидко росли, мали округлу форму з чіткими краями, стадія спороутворення характеризується жовто-зеленими відтінками. Верхівка конідієносія закінчується фіолідами – кеглеподібними або пляшкоподібними гілками. Конідії утворюються на фіалідах по одній.
3. Культивували *Trichoderma spp.* глибинним способом задля отримання інокуляту, яким інокулювали рисовий субстрат і отримували зернову культуру *Trichoderma spp.*

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Biona. Біологічні засоби захисту рослин. URL: <https://biona.ua>
2. Catalogue of biological products. 2025. URL: https://agritema.com/wp-content/uploads/2025/02/Agritema_catalogue_A4_2025_NEW.pdf
3. Chandralekaa R., Subramanian S., Suresh S., Kumar K. Biocontrol potential of fungal endophytes for pest management in cereals. *Biocontrol Science and Technology*. 2025. Vol. 35, No. 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1080/09583157.2024.XXXXXXX>
4. Convention on Biological Diversity. 2030 Targets (with Guidance Notes). Target 10: Enhance Biodiversity and Sustainability in Agriculture, Aquaculture, Fisheries, and Forestry. URL: <https://www.cbd.int/gbf/targets/10>
5. Convention on Biological Diversity. 2030 Targets (with Guidance Notes). Target 17: Strengthen Biosafety and Distribute the Benefits of Biotechnology. URL: <https://www.cbd.int/gbf/targets/17>
6. Filho F., J. A., Horta, M. A. C., Dos Santos, C. A., Almeida, D. A., Murad, N. F., Mendes, J. S., Sforça D. A., Silva C. B. C., Crucello A. de Souza A. P. Integrative genomic analysis of the bioprospection of regulators and accessory enzymes associated with cellulose degradation in a filamentous fungus (*Trichoderma harzianum*). *BMC Genomics*. 2020 Nov 2;21:757. doi: 10.1186/s12864-020-07158-w <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-020-07158-w>
7. Enzim Group. Біологічні препарати для сільського господарства. URL: <https://enzim.uaBTU-Center>.
8. Guzmán-Guzmán P., Kumar A., de los Santos-Villalobos S., Parra-Cota F. I., Orozco-Mosqueda M. del C., Fadiji A. E., Hyder S., Babalola O. O., Santoyo G. *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases – A Review. *Plants*. 2023. Vol. 12, No. 3. Article 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>

9. Harman G. E. et al. *Trichoderma: Biology and applications*. Wallingford: CABI Publishing. 2021. Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M., Schmoll M. *Trichoderma: Biology and Applications*. Wallingford: CABI Publishing, 2013. 327 p. ISBN: 9781780642475.
10. Kostenko O., Soler R., Pozo M. J. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756368>
11. Kredics László, Antal Zsuzsanna, Manczinger László, Szekeres András, Kevei Ferenc, Nagy Erzsébet. Recent advances in the use of *Trichoderma*-containing multicomponent microbial inoculants for pathogen control and plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024. Vol. 40, No. 2. Article 52. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03861-5>
12. Kubicek C. P., Herrera-Estrella A., Seidl-Seiboth V., Martinez D. A., Druzhinina I. S., Thon M., Zeilinger S., Casas-Flores S., Horwitz B. A., Mukherjee P. K., Mukherjee M., Kredics L., Alcaraz L. D., Aerts A., Antal Z., Atanasova L., Cervantes-Badenes M. P., Challacombe J., Chertkov O., McCluskey K., et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 2011. Vol. 12. R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
13. Lopes F. A. C., Steindorff A. S., Geraldine A. M., Brandão R. S., Monteiro V. N., Lobo-Júnior M., Coelho A. S. G., Ulhoa C. J., Silva R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains for biological control of plant pathogens. *Fungal Biology*. 2012. Vol. 116, No. 10. P. 1213–1222. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.07.001>
14. Lorito M., Woo S. L. *Trichoderma: A multipurpose tool for integrated pest management*. *Annual Review of Phytopathology*. 2015. Vol. 53. P. 395–421. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120204>
15. Manzar, N., Kashyap, A.S., Goutam, R.S., Rajawat, M.V.S., Sharma, P.K., Sharma, S.K., Singh, H.V. *Trichoderma: Advent of Versatile Biocontrol*

- Agent, Its Secrets and Insights into Mechanism of Biocontrol Potential. Sustainability 2022, 14, 12786. <https://doi.org/10.3390/su141912786>
16. Martinez Y., López-Bucio J., Hernández-Mendoza J. L., Santoyo G. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023. Vol. 107. P. 5679–5695. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12574-2>
 17. Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A., Schmoll M., Kenerley C. M. *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*. 2013. Vol. 51. P. 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
 18. Shimbori E. M., Querino R. B., Costa V. A., Zucchi R. A. Taxonomy and Biological Control: New Challenges in an Old Relationship. *Neotropical Entomology*. 2023. Vol. 52(3). P. 351–372. <https://doi.org/10.1007/s13744-023-01025-5>
 19. Singh D., Geat N., Singh J. K., Verma A., Sharma R., Singh R. L., Raj M. H., Kumar K. R. Isolation and characterization of biocontrol microbes for development of effective microbial consortia for managing *Rhizoctonia bataticola* root rot of cluster bean under hot arid climatic conditions. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12(11). 2331. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112331>
 20. Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., Valéro J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol. 37, No. 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
 21. Vinale F., Sivasithamparam K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytoterapi Research*. Vol. 34 (11). 2020. – 2835-2842. <https://doi.org/10.1002/ptr.6728>
 22. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. Vol. 40, No. 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>

23. Woo S. L., Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Plant Disease*. 2017. Vol. 101, No. 7. P. 1036–1049. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0492-FE>
24. Yao X., Guo H., Zhang K., Zhao M., Ruan J., Chen J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Front. Microbiol.* 14:1160551. doi: 10.3389/fmicb.2023.1160551
25. Zhang J-L, Tang W-L, Huang Q-R, Li Y-Z, Wei M-L, Jiang L-L, Liu C, Yu X, Zhu H-W, Chen G-Z and Zhang X-X *Trichoderma*: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12. Article 723828. doi: 10.3389/fmicb.2021.723828
26. Zhang, Y., Xiao, J., Yang, K., Wang, Y., Tian, Y., and Liang, Z. (2022). Transcriptomic and metabonomic insights into the biocontrol mechanism of *Trichoderma asperellum* M45a against watermelon *Fusarium* wilt. *PLoS One* 17:e0272702. doi: 10.1371/journal.pone.0272702
27. Біотехнологічні препарати для рослинництва. URL: <https://btu-center.comAgritema>.
28. Бунас А. А., Ткач Є. Д., Дворецький В. В. Біопрепарати в Україні та світі: сучасні тренди й перспективи. *Агроекологічний журнал*. 2024. № 4. С. 132–140. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2024.317163>
29. Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. 2024. URL: <https://eco.gov.ua/registers/perelik-pesticidiv-iagrohimikativ-dozvolenih-dlya-vikoristannya>
30. Крутякова В., Гулич О., Янсе Л. Стан і проблеми ринку біологічних засобів захисту рослин в Україні. *Вісник аграрної науки*. 2023. Т. 101. № 1. С. 30–39. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202301-04>
31. Крутякова В. І. Біометод – основа сталого розвитку вітчизняного землеробства. *Вісник аграрної науки*. 2020, №9 (810) С. 5-14 doi: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202009-01>