

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТУ СКЛЕРОЦИД® ТА ЙОГО МІКРОБНИХ СКЛАДОВИХ ПРОТИ ЗБУДНИКА БІЛОЇ ГНИЛІ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY

В.А. Болоховська¹, О.В. Нагорна¹, Н.М. Волощук^{1,2},
В.В. Болоховський¹, О.М. Стерлікова¹, Т.О. Хоменко¹,
В.В. Бородай^{1,3,4}

¹Компанія BTU Biotech (м. Ладизжин, Вінницька обл., Україна)

e-mail: valent2006@ukr.net; ORCID: 0009-0005-2728-4589

e-mail: olganova2008@ukr.net; ORCID: 0009-0001-6628-9383

e-mail: vlad@btu-center.com; ORCID: 0009-0007-0074-6362

e-mail: chmiloksana@gmail.com; ORCID: 0000-0002-1952-7844

e-mail: volyata@gmail.com; ORCID: 0000-0003-4095-3706

²Університет штату Пенсильванія (Юніверсіті Парк, США)

e-mail: voloshchuk_t_nataliia@ukr.net; ORCID: 0000-0002-9852-734X

³Національний університет біоресурсів і природокористування України
(м. Київ, Україна)

⁴Інститут агроєкології і природокористування НААН (м. Київ, Україна)

e-mail: veraboro@gmail.com; ORCID: 0000-0002-8787-8646

Застосування біопрепаратів на основі консорціуму мікроорганізмів із різноманітними механізмами дії, а саме пригніченням розвитку, утворення склероціїв, апотеціїв із аскоспорами *Sclerotinia sclerotiorum*, інших фітопатогенів, індукуванням стійкості рослин, матиме пролонговану дію щодо зменшення пестицидного навантаження в агро-ценозах культурних рослин. Антифунгальну дію культуральних рідин мікроорганізмів і складових та комплексного біопрепарату Склероцид® щодо росту, розвитку міцелію та склероціїв *S. sclerotiorum*, *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Drechslera sorokiniana*, *Verticillium lateritium*, *Cladosporium herbarum* вивчали за методами подвійних культур, дифузії в агар (метод лунок) і модифікованим методом агарових блоків. Статистичну обробку даних проводили за програмами Microsoft Office Excel® для Microsoft Windows 2010 і GraphPad Prism версії 10.4.2.633. Встановлено високу антифунгальну дію мультикомпонентного біопрепарату Склероцид® та його складових *C. minitans* IMB F-100120, *Trichoderma harzianum* IMB F-100097 *B. subtilis* IMB B-7678 і *B. licheniformis* IMB B-7778, пригнічення розвитку склероціїв та росту міцелію *S. sclerotiorum* високого ступеня, пролонговану дію щодо стримування розвитку ґрунтових патогенів. Стимування розвитку міцелію збудника білої гнилі спостерігали впродовж 35 днів за сумісного культивування грибів *C. minitans* IMB F-100120 та *S. sclerotiorum*. До того ж відбувалась колонізація склероціїв *S. sclerotiorum* із утворенням пікноспор, значне уповільнення формування нових склероціїв. Унікальність штаму *C. minitans* IMB F-100120 полягає в пролонгованому стримуванні розвитку ґрунтових патогенів *V. lateritium*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *D. sorokiniana* та *A. alternata*. Інгібуючий ефект *Sclerotyd*® становив щодо *S. sclerotiorum* — 91,2–100% порівняно з контролем, *F. sporotrichioides* — 69,1–72,8%, *F. graminearum* — 73,4–83,4%, *F. solani* — 74,2–100%, *F. culmorum* — 57,2–71,5%, *F. verticillioides* — 69,1–78,6%, *A. alternata* — 69,3–74,4%, *B. cinerea* — 80,4–100%. У подальших дослідженнях заплановано вивчати механізми дії складових препарату Склероцид® щодо збудників хвороб.

Ключові слова: біофунгіцид, консорціум мікроорганізмів, фітопатогени, антифунгальна дія.

ВСТУП

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary є збудником склеротиніозу, або білої гнилі, однієї з найрозповсюдженіших грибних хвороб у світі. Це неспеціалізований некротрофний патоген із широким спектром дії — поліфаг, що уражує понад 500 видів дводольних культурних і дикорослих рослин, зокрема ключові сільськогосподарські культури, що призводить до значних економічних збитків через зниження врожайності та погіршення якості продукції [1–3].

У патогенезі *S. sclerotiorum* беруть участь ферменти, щавлева кислота, різноманітні гени і секреторні білки гриба, як основні чинники вірулентності. Джерелом інфекції *S. sclerotiorum* є склероції, що утворюються з міцелію і здатні зберігати життєздатність у ґрунті до 10 років, підвищуючи ризик зараження рослин [3; 4].

Стратегія довгострокового захисту рослин від збудника білої гнилі, за дослідженнями українських та іноземних вчених, обмежена біологічними особливостями розвитку патогена, серед яких варто зазначити тривалий період виживання склероцій у ґрунті без рослин-господарів, розташування по профілю ґрунту, карпогенний і міцеліогенний шляхи їх проростання відповідно до умов середовища. Це забезпечує збуднику можливість поширення як повітряно-крапельним, так і ґрунтовими шляхами завдяки періодам формування аскоспор в апотеціях [5], наявності штамів склеротинії, стійких до синтетичних фунгіцидів, а також через відсутність резистентних генотипів рослин [2; 6]. Тому надзвичайно актуальними є стратегії біологічного контролю *S. sclerotiorum* [5; 7; 8].

Останніми роками дедалі більше уваги приділяється розробці комплексних біопрепаратів для пригнічення фітопатогенних мікроорганізмів, складові яких характеризуються потенційною активністю, що зумовлена взаємодією ретельно підібраних видів антагоністів [5].

Ефективна протидія *S. sclerotiorum* потребує застосування комбінованих методів: хімічного й біологічного захисту, дотримання сівозміни та використання

стійких сортів. *Paraphaeosphaeria minitans* (W.A. Campb.) Verkley (син. *Paraconiothyrium minitans* (W.A. Campb.) Verkley, базіонім *Coniothyrium minitans* W.A. Campbell) є спеціалізованим мікопаразитом, відомим своєю ефективністю в боротьбі безпосередньо з *S. sclerotiorum* [3–5; 9]. Однак, окрім збудника білої гнилі, рослини уражуються іншими фітопатогенами, що зберігаються у ґрунті і з якими *P. minitans* не взаємодіє. Склероції *S. sclerotiorum*, перебуваючи в ґрунті, можуть бути осередками розвитку супутніх інфекцій, зокрема збудниками корневих гнилей та в'янення (*Fusarium* spp., *Drechslera* spp.), а також пліснявіння насіння (*Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) [7]. Комплексний підхід може допомогти одночасному вирішенню проблеми поширення і розвитку інших збудників хвороб, що передаються через ґрунт. Застосування біопрепаратів із різними механізмами дії, зокрема тих, що індукують стійкість рослин, пригнічують формування склероцій *S. sclerotiorum* та апотеціїв з аскоспорами, сприятиме зменшенню використання фунгіцидів, матиме пролонговану дію і знижуватиме пестицидне навантаження.

Ефективність біоконтролю проти збудника білої гнилі, особливості синергічної взаємодії мікопаразита *P. minitans* та штамів-продуцентів *Trichoderma* spp. і *Bacillus* spp. у складі консорціуму та окремо, вивчено недостатньо. Тому дослідження в цьому напрямі є надзвичайно актуальним.

Метою дослідження було вивчення характеру росту міцелію та особливостей формування склероцій фітопатогена *S. sclerotiorum* на різних за складом живильних середовищах, ефективності застосування комплексного біопрепарату Склероцид® (BTU Biotech company, Україна) та його мікробних складових проти збудника білої гнилі *S. sclerotiorum* та інших фітопатогенів.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Штами *P. minitans*, *Trichoderma* spp. та *Bacillus* spp. є найрозповсюдженішими агентами біологічного контролю, які значно

зменшують поширення білої гнилі та кількість склероціїв у ґрунті [7].

Одним із механізмів взаємодії *P. minitans* і *Trichoderma* spp. з фітопатогенами є мікопаразитизм [1; 7]. Як високоспецифічний мікопаразит *P. minitans* продукує широкий спектр ферментів (хітинази та глюканаз), що руйнують оболонку склероціїв *S. sclerotiorum* та сприяють розкладанню щавлевої кислоти. Вторинні метаболіти *P. minitans*, такі як макросфелід А, бензофурани та хромани призводять до деградації склероціїв, пригнічують їх карпогенне проростання [10]. Ушкоджені склероції втрачають здатність до утворення плодівих тіл — апотеціїв, сформовані спори в яких є основним джерелом первинної інфекції та розповсюдження хвороби впродовж вегетації [11].

Гриби роду *Trichoderma* широко використовуються як агенти біологічного контролю [3–5]. Механізмами, за допомогою якого *T. harzianum* контролює *S. sclerotiorum*, переважно є гіфальний, а не склероціальний мікопаразитизм за участі таких ферментів, як хітинази, глюканаз, протеази та целюлази, а також зменшення щільності апотеціїв [3–5].

Значне обмеження *in vitro* росту гіф, зниження життєздатності склероціїв *Sclerotinia* spp. і формування апотеціїв з аскоспорами було встановлено за дії бактерій — антагоністів з роду *Bacillus*, які продукують феноли, циклічні ліпопептиди, включаючи ітурин, фенгіцин і сурфактин, леткі органічні сполуки (ЛОС) [12; 13]. Пригнічення *S. sclerotiorum* бактеріями роду *Bacillus* переважно відбувається за рахунок утворення пумілацидину, бацілібактину, бацілізину та інших антифунгальних сполук [14]. *Bacillus velezensis* 20507 здатен пригнічувати експресію генів, які кодуєть рибосомну субодиницю *S. sclerotiorum*, що призводить до інгібування синтезу білка [13], а також може спричиняти пошкодження клітинної мембрани [15].

За дослідженнями сканувальної та трансмісійної електронної мікроскопії, іноземні вчені Као та ін. (2023), Аязом та ін. (2024) показали морфологічну та мікро-

структурну деструкцію гіф *S. sclerotiorum*, оброблених *B. subtilis* RSS-1, у вигляді значного пошкодження клітинної стінки, розриву клітинної мембрани, зміщення цитоплазми та розпаду органел порівняно з необробленим контролем [16; 17]. Ушкодження гіфальної структури призводить до затримки росту і здатності до утворення склероціїв. Виявлено значне пригнічення активності полігалактуранази, целюлази та накопичення щавлевої кислоти — важливого чинника патогенності *S. sclerotiorum* за дії *B. subtilis* [16].

Одним з основних механізмів, відповідальних за активність біоконтролю *P. minitans*, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. є активація індукованої стійкості у рослин. Іноземними вченими Янгом та ін. (2020) встановлено, що надмірна експресія гена хітинази *CmCH1* у *P. minitans* призвела до збільшення накопичення H_2O_2 і активації захисних генів і ферментів у рослин сої, що підвищило її стійкість до *S. sclerotiorum* [18].

Мікроорганізми-антагоністи можуть по-різному впливати на *S. sclerotiorum* залежно від виду сільськогосподарської культури. Наприклад, іноземні вчені Вонг та ін. (2024) дослідили, що штами *Bacillus* продемонстрували високу ефективність на рослинах сої, тоді як на люцерні та квасолі звичайної — *P. minitans* та *Streptomyces* spp. відповідно [19].

P. minitans, *Trichoderma* spp. та *Bacillus* spp. переважно контролюють збудників хвороб рослин шляхом антибіозу, конкуренції, мікопаразитизму та індукції стійкості у рослин-господарів [20].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили в умовах лабораторії мікології (Інститут прикладної біотехнології, VTU Biotech). Для експериментальної роботи використовували живильні середовища картопляно-глюкозний агар (КГА) та Чапека-Докса з глюкозою із додаванням розчину стрептоміцину. Фунгіцидну активність чистих культур та культуральної рідини антагоністів, зокрема мікробних складових Склероциду®

P. minitans (*C. minitans*) IMB F-1000120, *Trichoderma lignorum*, *T. harzianum* IMB F-100097, *Bacillus subtilis* IMB B-7678, *B. licheniformis* IMB B-7778 перевіряли на склероціях, зібраних з уражених рослин та насіння соняшника, склероціях повторно отриманих у лабораторних умовах на КГА та на чистих культурах фітопатогенів, зокрема, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*, *S. sclerotiorum*, *Verticillium lateritium*.

Антифунгальну дію культуральних рідин штамів мікроорганізмів та комплексного біопрепарату Склероцид® вивчали методами подвійних культур, дифузії в агар та модифікованим методом агарових блоків [21; 22].

Статистичну обробку даних здійснювали використовуючи програму Microsoft Office Excel® для Microsoft Windows 2010 (Microsoft Co., Редмонд, Вашингтон, США) і GraphPad Prism версії 10.4.2.633 (GraphPad Software, Бостон, Массачусетс, США). Дані пригнічення росту були подані у вигляді стовпчастих діаграм, що представляють стандартну помилку середнього ($\pm$ SEM)% інгібування росту. Односторонній аналіз варіації (ANOVA) проводили завдяки GraphPad Prism версії 10.4.2.633. Значимість кожної взаємодії визначали за допомогою значення F. Коли спостерігався значний F-тест, поділ середніх робили

завдяки тестам Tukey HSD. Статистичну значущість виявляли за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення характеру росту та особливостей формування склероціїв фітопатогена *S. sclerotiorum*. За сприятливих умов склероції збудника білої гнилі *Sclerotinia sclerotiorum* можуть формувати щонайменше 6 генерацій, кожна з яких здатна продукувати близько 20 дочірніх склероціїв. Ці структури слугують резервуарами для супутніх патогенів, зокрема грибів родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Penicillium*, які спроможні заселяти склероції у ґрунті.

Дослідження показали, що склероції проростають з утворенням білого нещільного швидкоростучого міцелію на 2-гу добу інкубації на середовищах КГА та Чапека-Докса (рис. 1).

На 3–4-ту добу росту на міцелії спостерігається формування нових склероціїв у вигляді білих пухнастих скупчень, які згодом ущільнюються та на 7-му добу стають повністю сформованими і здатними проростати новим міцелієм та утворювати наступну генерацію склероціїв.

Встановлено, що склероції *S. sclerotiorum* краще формуються на напівприродному середовищі КГА, порівняно з синтетичним Чапека-Докса. На КГА на 7-му добу на міцелії з одного склероція сформувалось 20 нових склероціїв, тоді як на Чапека-

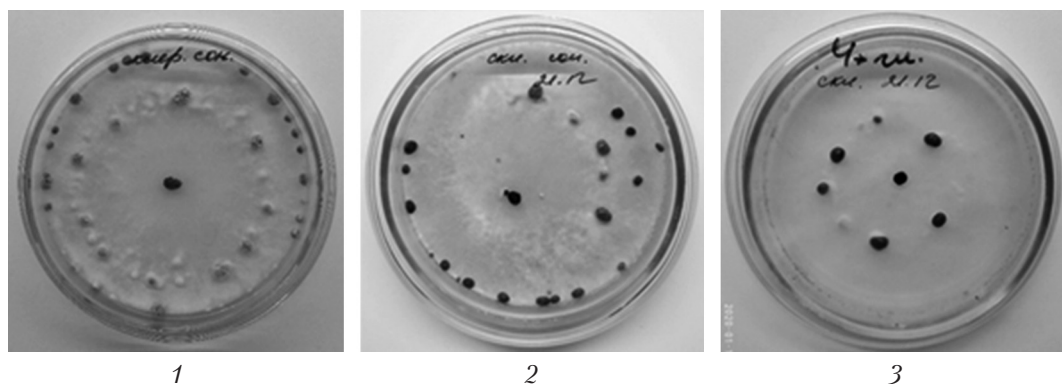


Рис. 1. Формування склероціїв гриба *S. sclerotiorum* на живильних середовищах: 1 — КГА на 4-ту добу; 2 — КГА на 7-му добу; 3 — Чапека-Докса з глюкозою на 7-му добу

Докса з'явилося лише 6. За подальшого розміщення вихідного склероцію на нове середовище КГА було отримано 29 дочірніх склероціїв. Це свідчить про те, що склероції краще формуються на субстратах близьких за складом до природних.

За 6-разового перенесення вихідного склероцію на нове середовище КГА в кожній наступній генерації отримали зменшення кількості склероціїв: у 1-й — 31 склероціїв; 2-й — 30; 3-й — 18; 4-й — 19; 5-й — 20; 6-й — 18 склероціїв (рис. 2).

Життєздатність склероціїв залежить від різних чинників — їхнього розміру, властивостей ґрунту, погодних умов, активності ґрунтових мікроорганізмів. Кожен склероцій за сприятливих умов може давати шість і більше генерацій.

Визначальними чинниками інфікування рослин є кількість склероціїв у ґрунті та їхня близькість до коренів рослин. Відповідно, середній термін життєздатності склероціїв 4–5 років, але за певних умов вони можуть зберігатись до 10 років [3]. Найдовше зберігаються склероції, які перебувають на поверхні ґрунту та на глибині до 6 см. Основними джерелами збудника білої гнилі є інфіковане насіння, ґрунт і рослинні рештки.

Зараження рослин *S. sclerotiorum* через міцелій від склероціїв, які знаходяться в ґрунті, зумовлює розвиток кореневої форми, що спричиняє системне ураження судинної системи та призводить до в'янення рослин. На склероціях, що опинилися на поверхні ґрунту, утворюються плоді тіла — апотеції з аскоспорами, які поши-

рюються повітряним шляхом і ініціюють зараження надземних органів рослин. На соняшнику ця форма хвороби проявляється у вигляді стеблової та кошикової гнилі, що супроводжується некрозами, розм'якшенням тканин і утворенням склероціїв, які потім потрапляють у ґрунт разом із рештками. Ураження кошиків соняшника білою гниллю може знижувати схожість насіння до 34%, кількість насіння в кошику — на 60,4%, а від прикореневої форми білої гнилі у період кінця цвітіння — початку наливу зерна, втрати врожаю з одного кошика можуть сягати 93,4%, на пізніших стадіях розвитку — 44,1% [23; 24].

Проведені нами дослідження продемонстрували, що склероції *S. sclerotiorum* є носіями інших ґрунтових патогенів, зокрема, родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Penicillium* (рис. 3).

Слід відмітити, що симптоми ураження поверхні склероціїв видами *Fusarium* та *Penicillium* були подібними, що свідчить про складність візуальної діагностики і важливість застосування біопрепарату комплексної дії з метою контролю супутньої інфекції.

Вивчення антагоністичної дії гриба *P. minitans* до *S. sclerotiorum*. Ефективність біоконтролю може залежати від сприйнятливості ізолятів *S. sclerotiorum* у певних ґрунтово-кліматичних умовах [25; 26]. Нікот із співавт. (2019), за швидкістю росту міцелію та утворенням склероціїв встановили різний рівень чутливості серед 75 штамів *S. sclerotiorum* до комерціалізованого штаму *P. minitans*, незалежно від їх географічного

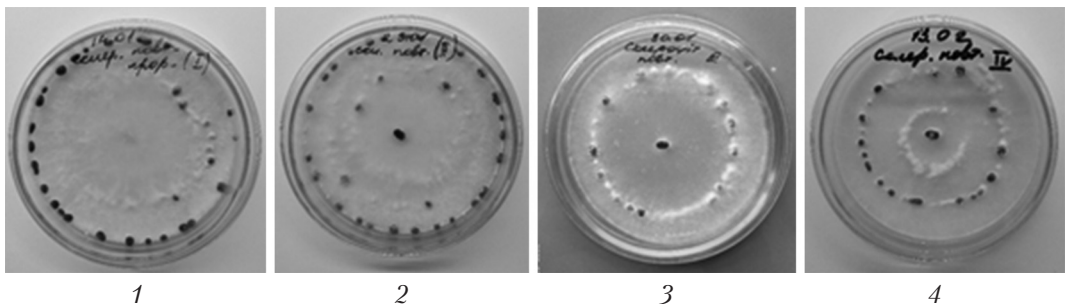


Рис. 2. Динаміка формування нових генерацій склероціїв *S. sclerotiorum* (КГА, 7-ма доба росту)

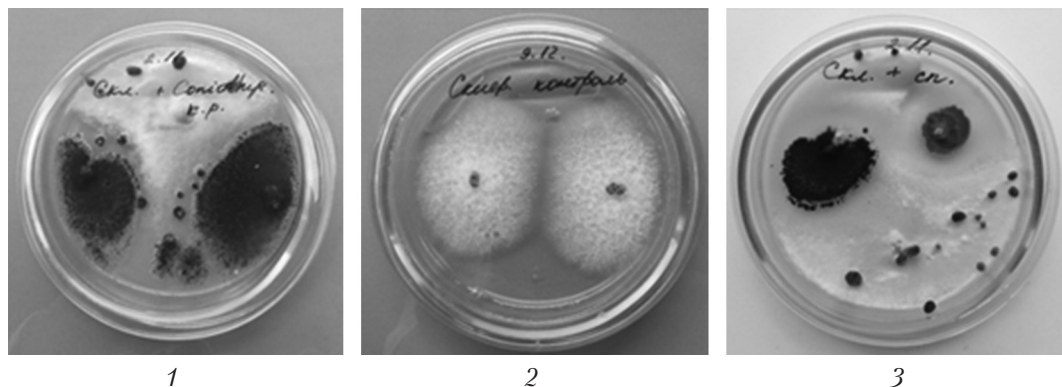


Рис. 3. Гриби, виділені із склероціїв збудника білої гнилі *S. sclerotiorum*:
1 – *Aspergillus niger*; 2 – *Fusarium* spp.; 3 – *Penicillium* spp.

походження та ґрунтово-кліматичних умов [25]. Отже, селекційний тиск може призвести до поступового збільшення частоти менш чутливих ізолятів залежно від поширення біологічного методу [25].

Наші дослідження, показали, що сумісне культивування грибів *P. minitans* IMB F-1000120 і *S. sclerotiorum* призводить до пригнічення формування нових склероціїв у збудника білої гнилі (рис. 4).

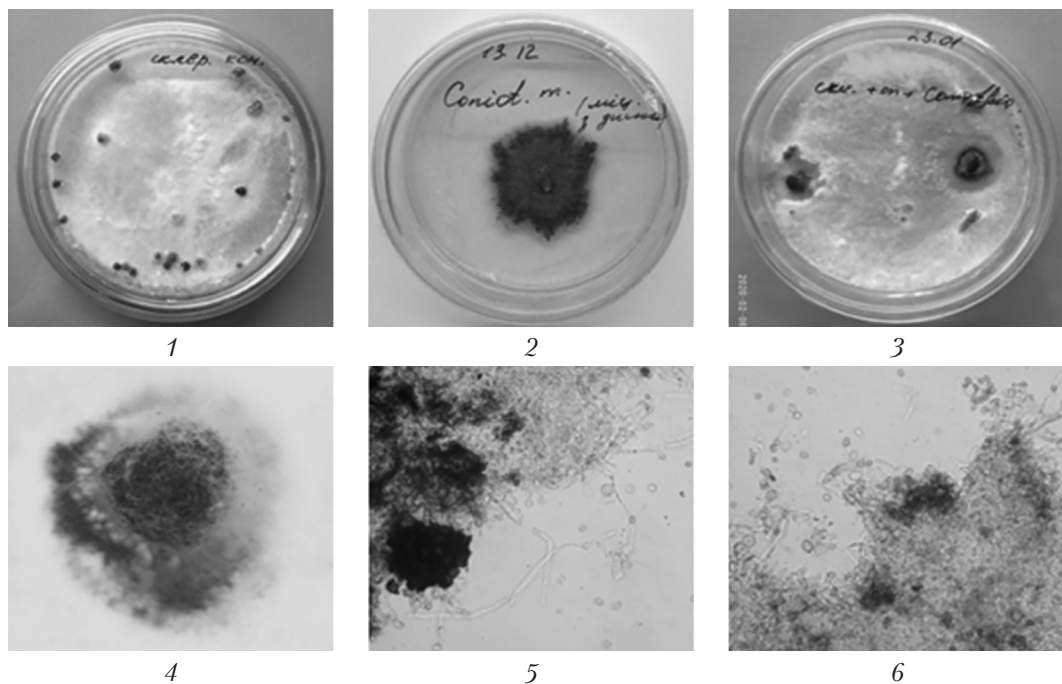


Рис. 4. Вплив культуральної рідини *P. minitans* IMB F-1000120 на проростання склероціїв *S. sclerotiorum*: 1 – контроль, склероції без обробки, 7-ма доба росту; 2 – контроль, *P. minitans* на 15-ту добу росту; 3 – склероції, оброблені к.р. *P. minitans*, 7-ма доба росту; 4 – склероцій, вкритий міцелієм *P. minitans*; 5, 6 – морфологія пікнід та пікноспор *P. minitans*, що зростає на склероціях

Вивчення антагоністичної дії *P. minitans* IMB F-1000120 щодо інших фітопатогенів. У результаті досліджень *P. minitans* IMB F-1000120 проявив низьку антифунгальну активність проти фітопатогенів *V. lateritium*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *D. sorokiniana* та *A. alternata* (рис. 5). Обробка склероціїв, інфікованих грибами роду *Fusarium*, культуральною рідиною *P. minitans*, продемонструвала його слабку фунгіцидну дію. На 4-ту добу культивування як необроблених, так і оброблених склероціїв, спостерігали активний ріст колоній грибів роду *Fusarium*.

Дослідження фунгіцидних властивостей антагоністів *Trichoderma lignorum* і *T. harzianum* IMB F-100097 та бактерій

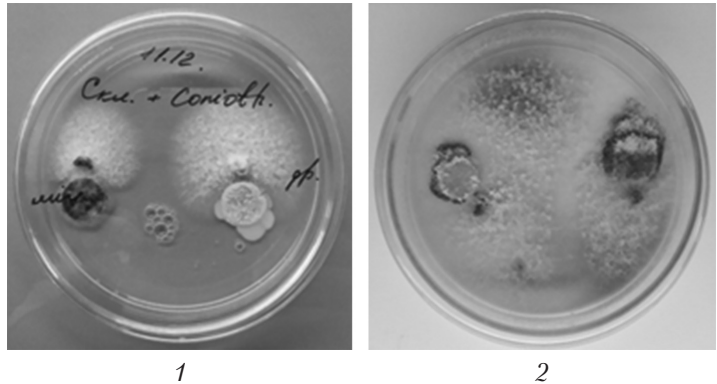


Рис. 5. Вивчення антифунгальної активності *P. minitans* щодо *Fusarium* spp., що колонізують склероції *S. sclerotiorum*: 1 – 4-та доба; 2 – 9-та доба (метод агарових блоків, КГА)

роду *Bacillus* щодо фітопатогенів. Встановлено слабку антагоністичну взаємодію між *T. lignorum* і *S. sclerotiorum*, зокрема збудник білої гнилі зафіксував інтенсивний ріст та формування склероціїв за їх сумісного культивування (рис. 6).

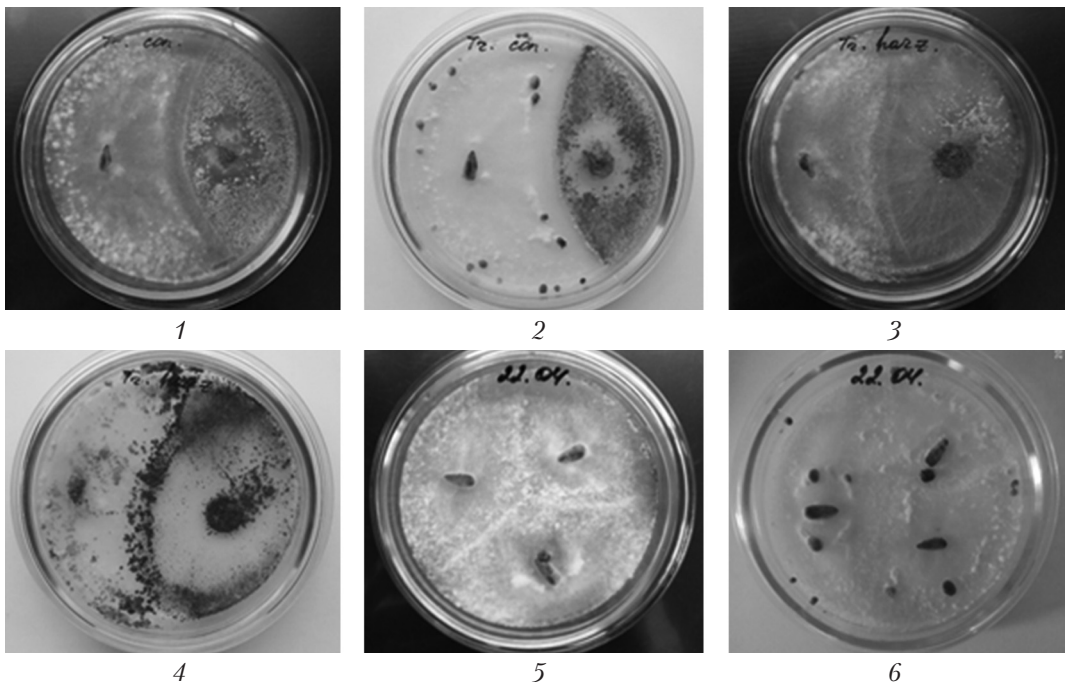


Рис. 6. Вивчення фунгіцидної дії грибів роду *Trichoderma* щодо *S. sclerotiorum*: 1, 2 – *S. sclerotiorum* та *T. lignorum*; 3, 4 – *S. sclerotiorum* та *T. harzianum* IMB F-100097; 5, 6 – *S. sclerotiorum* (контроль) (метод подвійних культур, КГА, відповідно 3-тя, 9-та доба)

Штам *T. harzianum* IMB F-100097 показав кращі фунгіцидні властивості під час сумісного культивування з *S. sclerotiorum* порівняно з *T. lignorum*, колонізуючи міцелій фітопатогена та гальмуючи його ріст.

Встановлено високу антагоністичну активність цього штаму щодо інших збудників хвороб рослин. Виявлено часткове наростання на колонії грибів *F. verticillioides* з формуванням зони інгібування та *B. cinerea* без зони затримки росту. Ріст *A. alternata*, *V. lateritium*, *D. sorokiniana*, *C. herbarum* зупинявся за безпосереднього контакту з міцелієм *T. harzianum* (рис. 7).

Сілва із співавт. (2022) за обробки склероціїв *S. sclerotiorum* суспензіями конідій штамів *Trichoderma* спостерігав сильне пригнічення міцеліогенного проростання в результаті помітної мікопаразитарної активності *T. asperelloides* СМАА 1584 [27]. Тоді як біостимулювальні ефекти на ріст

рослин бавовнику були більш вираженими з *T. lentiforme* СМАА 1585, який мав також вищу здатність розчиняти фосфати. Авторами рекомендовано використовувати ці штами *Trichoderma* в суміші для забезпечення як контролю патогенів, так і стимулювання росту рослин [27].

Отже, залежно від виду і штаму гриби роду *Trichoderma* здатні по-різному впливати на розвиток *S. sclerotiorum* та обмежувати ріст інших видів фітопатогенів, що можуть заселяти склероції в ґрунті.

У результаті проведених досліджень встановлена різна фунгіцидна дія культуральної рідини бактерій *B. subtilis* IMB B-7678 і *B. licheniformis* IMB B-7778 щодо фітопатогенів (рис. 8). Культуральна рідина *B. subtilis* IMB B-7678 незалежно від розведення продемонструвала 100% пригнічення росту *S. sclerotiorum*, тоді як *B. licheniformis* IMB B-7778 стримувала розвиток збудника білої гнилі на рівні 80%.

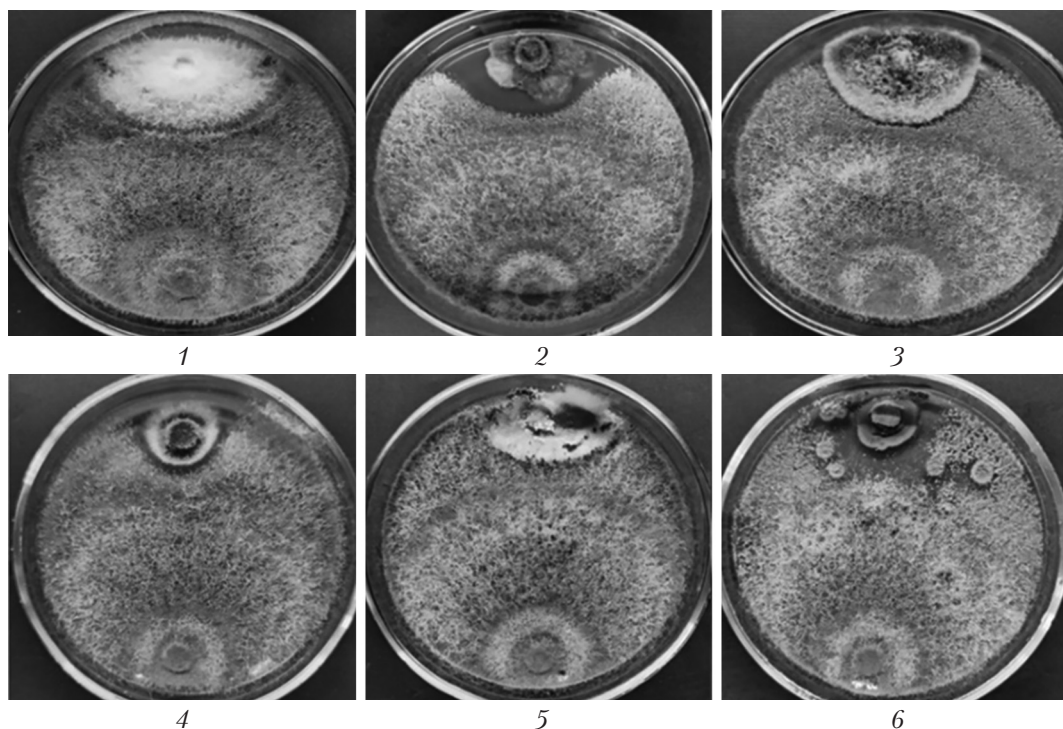


Рис. 7. Взаємодія між штамом *Trichoderma harzianum* IMB F-100097 та тест-культурами фітопатогенів: 1 – *F. verticillioides*; 2 – *D. sorokiniana*; 3 – *A. alternata*; 4 – *V. lateritium*; 5 – *B. cinerea*; 6 – *C. herbarum* (КГА, 9-та доба)

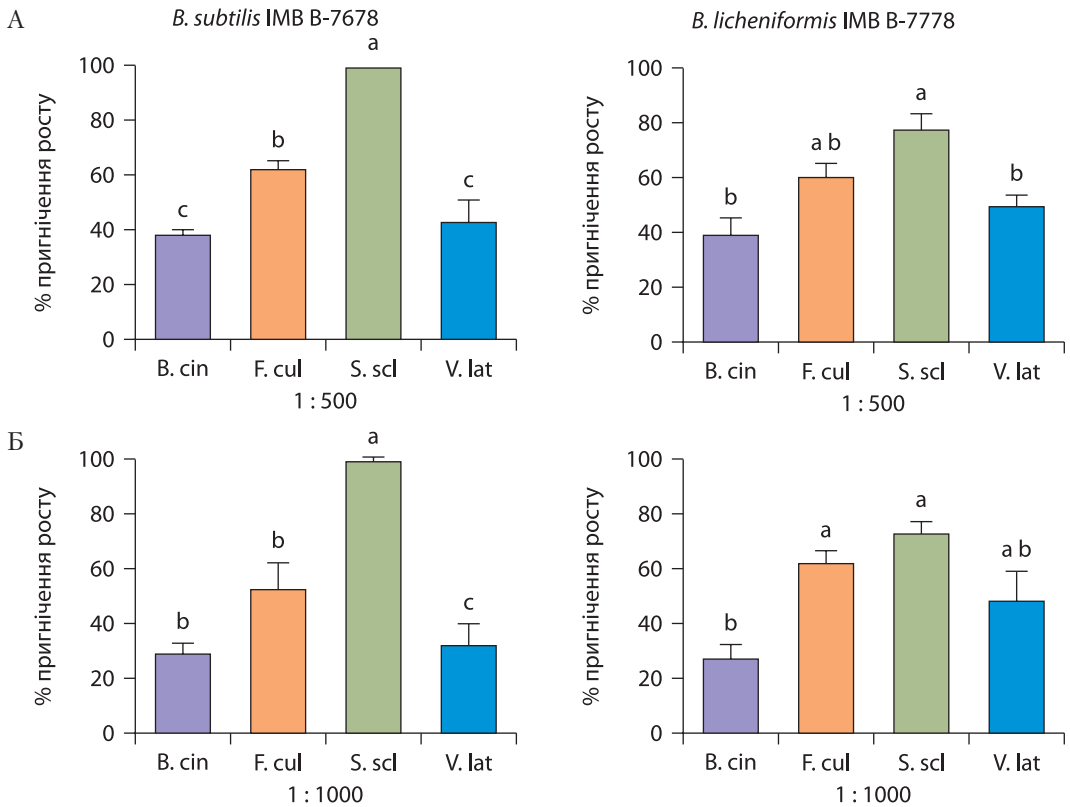


Рис. 8. Вплив культуральної рідини штамів *B. subtilis* IMB B-7678 та *B. licheniformis* IMB B-7778 на ріст фітопатогенів у розведеннях 1: 500 (Панель А) і 1:1000 (Панель Б)

Примітки: ріст вимірювали за діаметром колонії через 7 діб і представляли як % пригнічення росту відносно діаметра колонії без препарату (контроль) із стандартною помилкою середнього $\pm$ SEM ($n=3$). Літери над гістограмами вказують на статистичну значущість із використанням одностороннього аналізу ANOVA з наступним тестом множинного порівняння Tukey HSD, $P<0,05$.

Культуральна рідина обох штамів у розведенні 1:500 мала більший антифунгальний ефект на *B. cinerea*, гальмуючи його ріст на 40% порівняно із 30% отриманими за застосування 1:1000. *F. culmorum* та *V. lateritium* виявились більш чутливими до культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-7778 у розведенні 1:1000 порівняно з *B. subtilis* IMB B-7678.

Тому, проведені експерименти демонструють різну індивідуальну антифунгальну активність мікробних компонентів препарату Склероцид® щодо збудника білої гнилі *S. sclerotiorum* та інших фітопатогенів.

Дослідження ефективності комплексного препарату Склероцид®. Деякі роботи

вказують на антагоністичні відносини між окремими штамми за сумісного використання, що може знижувати ефективність біопрепаратів. Наприклад, певні штами *Trichoderma* здатні пригнічувати ріст окремих штамів *B. subtilis* [28]. Втім, низка досліджень показує синергічну дію підібраних штамів. Зокрема, доведено ефективність використання мікробного консорціуму, до складу якого входять *Pseudomonas aeruginosa* PJHU15, *Trichoderma harzianum* TNHU27 та *Bacillus subtilis* BHHU100, у тепличних і польових умовах для захисту гороху (*Pisum sativum*) від *S. sclerotiorum*. Ефективність цього консорціуму перевищувала дію окремих агентів або їхніх

парних комбінацій. У рослин, оброблених мікробними консорціумами, порівняно з необробленими контрольними рослинами, зараженими *S. sclerotiorum*, спостерігали зниження розвитку збудника хвороби. Крім того, мікробний комплекс забезпечив максимальне стимулювання росту рослин як у присутності, так і за відсутності патогену: спостерігалось збільшення довжини рослин, загальної біомаси, кількості листків, бульбочок і вторинних коренів, а також умісту хлорофілу, каротиноїдів і врожайності [29]. Лю зі співавт. (2022) встановили сумісність штамів *Trichoderma atroviride* SG3403 та *Bacillus subtilis* 22 за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, яка виявила життєздатні бактеріальні клітини на поверхні гіфів гриба у спільних культурах [30]. Отриманий консорціум засвідчив виражену синергічну дію, продукуючи метаболіти з антифунгальними властивостями, здатні пригнічувати ріст *Fusarium graminearum* на рослинах пшениці. У клітинах патогена спостерігалися істотні морфологічні ушкодження: деформація клітинної стінки, руйнування цитоплазми та субклітинних органел. Окрім того, було зафіксовано значне зменшення продукції мікотоксинів дезоксиніваленолу та зеараленону. Біоагенти також активували експресію захисних генів пшениці (*PR1*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, *ACS* та *SOD*) через сигнальні шляхи жасмонової кислоти та етилену, що сприяло формуванню індукованої системної резистентності проти фузаріозу [30]. Ву зі співавт. (2018) встановили, що антимікробний ефект комбінованого препарату, до складу якого входили *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 та

Trichoderma asperellum GDFS1009, був значно вищим порівняно з ефектом окремих штамів. Такий результат зумовлений посиленням синтезом антимікробних сполук та певних амінокислот [31]. Сумісне застосування *P. minitans* та *T. harzianum* значно пригнічувало розвиток *S. sclerotiorum* та сприяло найвищому приросту врожаю рослин салату [32]. Завдяки пластичності геномів мікроорганізмів щодо багатьох екологічних функцій і різноманітних біохімічних механізмів біологічні агенти біоконтролю позитивно впливають на ріст рослин та індукують стійкість рослин проти біотичного й абіотичного стресів [18; 27].

Під час дослідження ефективності комплексного біопрепарату Склероцид[®], до складу якого входять мікробні штами *P. minitans* IMB B-1000120, *T. harzianum* F-100097, *B. subtilis* IMB B-7678 та *B. licheniformis* IMB B-7778, було встановлено його високу антагоністичну активність щодо фітопатогенів.

Наприклад, обробка склероціїв препаратом Склероцид[®] призвела до пригнічення проростання та розвитку міцелію *S. sclerotiorum* (рис. 9).

Біопрепарат Склероцид[®] продемонстрував виражену антифунгальну активність проти фітопатогенів *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* та *Sclerotinia sclerotiorum* (рис. 10).

Препарат у розведенні 1:10 повністю пригнічував ріст *B. cinerea*, *F. solani* та *S. sclerotiorum*. Розведення 1:100 і 1:200 гальмували їхній ріст у межах 80–100%.

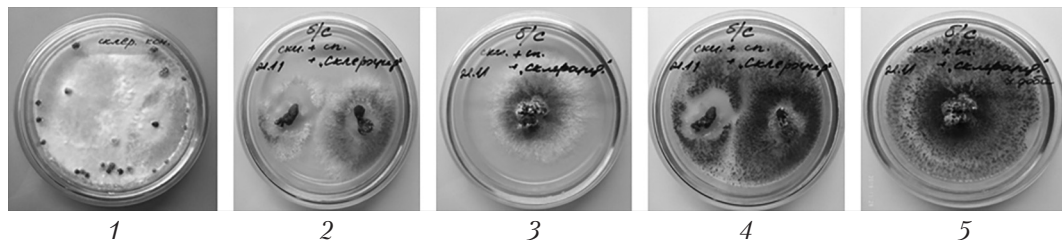


Рис. 9. Вплив обробки препаратом Склероцид[®] на проростання склероціїв *S. sclerotiorum*: 1 — контроль; 2, 3 — на 5-ту добу; 4, 5 — на 7-ту добу

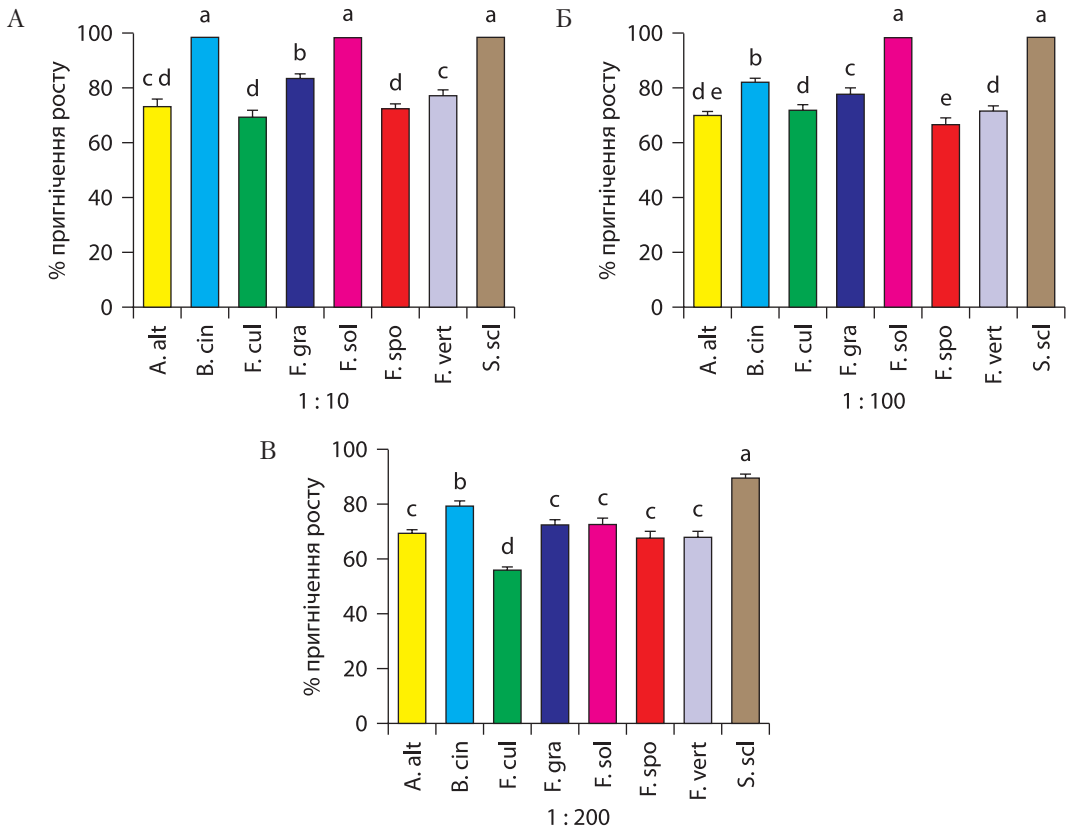


Рис. 10. Вплив біопрепарату Склероцид® на ріст фітопатогенів у розведеннях 1: 10 (А), 1: 100 (Б) і 1: 200 (В)

Примітка: ріст вимірювали за діаметром колонії через 7 діб і представляли як % пригнічення росту відносно діаметра колонії без препарату (контроль) із стандартною помилкою середнього $\pm$ SEM ($n=3$). Літери над гістограмами вказують на статистичну значущість із використанням одностороннього аналізу ANOVA з наступним тестом множинного порівняння Tukey HSD, $P<0,05$.

Загалом, усі випробувані концентрації препарату продемонстрували високу проти-грибну активність (60–80%) щодо інших досліджуваних збудників хвороб. Порівняння впливу окремих мікробних компонентів на фітопатогени з їхньою активністю в консорціумі фіксують вищу ефективність завдяки синергічній дії. Наприклад, підсилений ефект чітко спостерігається на культурах *B. cinerea* і *F. culmorum*. Культуральні рідини штабів бактерій знижували їхній ріст на 40% і 60% відповідно (див. рис. 8), тоді як під впливом комплексного препарату ріст пригнічувався на 100% і 80%, відповідно (див. рис. 10).

Синергічний ефект препарату Склероцид® можна пояснити антагоністичними властивостями штабів його мікробного складу. Відомо, що *P. minitans*, *Trichoderma* spp. та *Bacillus* spp. володіють унікальними біологічними властивостями, що дає можливість розробляти ефективні комплексні біопрепарати для контролю *S. sclerotiorum*. Зокрема, штами *Bacillus* продукують антибіотики та ліпопептиди з високою антимікробною активністю, *Trichoderma* синтезують гідролітичні ферменти, що руйнують клітинні стінки фітопатогенних грибів та паразитують на їхніх гіфах, а *P. minitans* проявляє гіперпаразитизм щодо склеро-

цій *S. sclerotiorum* і здатний розщеплювати шавлеву кислоту, яка є одним із головних чинників патогенності цього збудника.

ВИСНОВКИ

Використання мікробних консорціумів є ефективним методом біологічного захисту рослин, що підтверджено результатами наших досліджень з біофунгіцидом Склероцид®, який демонструє високу ефективність у польових умовах. Поєднання мікроорганізмів із різними властивостями та функціями забезпечує синергійний ефект у боротьбі з фітопатогенами. Штами антагоністів, що входять до складу Склероциду®,

ефективно обмежують ріст і розвиток збудників хвороб, зокрема *S. sclerotiorum* та інших фітопатогенів. Інгібуюча дія препарату істотно перевищує ефективність кожного з його компонентів у монокультури.

Отже, створення та впровадження комбінованих біопрепаратів в інтегровані системи захисту рослин дасть можливість ефективніше стримувати розвиток збудників хвороб. Це, своєю чергою, зменшить потребу в хімічних засобах захисту, як-от фунгіциди та добрива, і сприятиме виробництву більш безпечної та екологічно чистої продукції для споживачів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tsapikounis, F., Ipsilandis, C., & Greveniotis, V. (2019). Studies on the infection and parasitism course of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by three different mycoparasites. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(1). DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00210-2>.
2. Pivovskiy, M. Y., Kyryk, M. M., & Borodai, V. V. (2020). Phytotoxic properties of culture filtrates of micromycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from the phyllosphere of various host plants. *Біологічні системи: теорія та інновації*, 11, 1, 60–68. DOI: <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.060>.
3. Zhu, Y., Wu, C., Deng, Y., Yuan, W., Zhang, T., & Lu, J. (2024). Recent advances in virulence of a broad host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a mini-review. *Frontiers in microbiology*, 15, 1424130. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1424130>.
4. Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. P., & Mostofa, M. G. (2023). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. *Cells*, 12(7), 1063. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12071063>.
5. Viet-Cuong, H., Pippa, M., Swift, B. & Sarita, B. (2023). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*: Modes of action of biocontrol agents, soil organic amendments, and soil microbiome manipulation. *Biological Control*, 186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105346>.
6. Mao, X. W., Li, J. S., Chen, Y. L., Song, X. S., Duan, Y. B., Wang, J. X., ... Hou, Y. P. (2018). Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic. Biochem. Phys.*, 144, 27–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.010>.
7. Smolińska, U. & Kowalska, B. (2018). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. *Journal of Plant Pathology*, 100. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>.
8. Petkova, M., & Dimova, M. (2024). Biological Control of Lettuce Drop (*Sclerotinia minor* Jagger) Using Antagonistic *Bacillus* Species. *Applied Microbiology*, 4 (3), 1283–1293. DOI: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030088>.
9. Verkley, G. J., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., & Stielow, J. B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia*, 32, 25–51. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158514X679191>.
10. Xu, Y., Wu, M., Zhang, J., Li, G., & Yang, L. (2022). Cloning and molecular characterization of CmOxd3 coding for oxalate decarboxylase in the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Journal of fungi*, 8(12), 1304. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8121304>.
11. Wang, Y., Yu, H., Xu, Y., Wu, M., Zhang, J., Tsuda, K., ... Yang, L. (2023). Expression of a mycoparasite protease in plant petals suppresses the petal-mediated infection by necrotrophic pathogens. *Cell reports*, 42(11), 113290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113290>.
12. Sabaté, D. C., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological research*, 211, 21–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.003>.
13. Cheng, Y., Lou, H., He, H., He, X., Wang, Z., Gao, X., & Liu, J. (2024) Genomic and biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* using an extracellular extract from *Bacillus velezensis* 20507. *Front. Microbiol.*, 15, 1385067. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1385067>.
14. Ribeiro, I. D. A., Bach, E., da Silva Moreira, F., Müller, A. R., Rangel, C. P., Wilhelm, C. M., ... Passaglia, L. M. P. (2021). Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. *Microbiological*

- research, 248, 126754. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126754>.
15. Sur, S., Romo, T. D., & Grossfield, A. (2018). Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics. *J. Phys. Chem. B*, 122, 2219–2226. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11889>.
 16. Cao, S., Jiang, B., Yang, G., Pan, Y., Chen, F., Gao, Z., & Dai, Y. (2023). Isolation and evaluation of *Bacillus subtilis* RSS-1 as a potential biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Eur J Plant Pathol.*, 166, 9–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02642-x>.
 17. Ayaz, M., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Ali, F., Rashid, K. A., ... Qi, R.-D. (2024). Exploring plant growth promoting traits and biocontrol potential of new isolated *Bacillus subtilis* BS-2301 strain in suppressing *Sclerotinia sclerotiorum* through various mechanisms. *Front. Plant Sci.*, 15, 1444328. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1444328>.
 18. Yang, X., Yang, J., Li, H. et al. (2020). Overexpression of the chitinase gene CmCH1 from *Coniothyrium minitans* renders enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Transgenic Res*, 29, 187–198. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00190-2>.
 19. Wang, S. Y., Zhang, Y. J., Chen, X., Shi, X. C., Herrera-Balandrano, D. D., Liu, F. Q., & Laborda, P. (2024). Biocontrol methods for the management of *Sclerotinia sclerotiorum* in legumes: A review. *Phytopathology*, 114(7), 1447–1457. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-24-0006-RVW>.
 20. Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B. C., Tewari, A. K., & Kumar, J. (2018). Review on plant-trichoderma-pathogen interaction. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7, 2382–2397. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.702.291>.
 21. Dudka, I. A., Vasser, S. P., & Jellanskaja, I. A. (1982). *Methods of experimental mycology*. Kiev: Naukova dumka.
 22. Maheshwari, R. (Ed.) (2011). *Fungi: Experimental Methods in Biology* (2nd ed). Boca Raton: CRC Press.
 23. Ткаленко, Г. М., Борзих, О. І., & Ігнат, В. В. (2020). Сучасний стан застосування біологічних засобів захисту рослин в агроценозах України. *Вісник аграрної науки*, 12, 18–25. DOI: <https://doi.org/10.31073/agroviznyk202012-03>.
 24. Кириченко, В. В., Макляк, К. М., Петренко-ва, В. П., Кучеренко, Є. Ю., Звягінцева, А. М., Харитоненко, Н. С., & Михайленко, В. О. (2020). *Соняшник. Спеціальна селекція: моногр.* (В. В. Кириченко, Ред.). Харків: Новий курс.
 25. Nicot, P. C., Avril, F., Duffaud, M., Leyronas, C., & Troulet, C. (2019). Differential susceptibility to the mycoparasite *Paraphaeosphaeria minitans* among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. *Tropical Plant Pathology*, 44(1), 82–93. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0256-7>. fhal-02623473f.
 26. Vizi, R., Kiss, J., Turóczy, G., Dobra, N., & Pálkás, Z. (2024). Do morphological variations in *Sclerotinia sclerotiorum* strains indicate differences in aggressiveness? *Stresses*, 4(2), 367–379. DOI: <https://doi.org/10.3390/stresses4020024>.
 27. Silva, L. G., Camargo, R. C., Mascarín, G. M., Nunes, P. S. O., Dunlap, C. & Bettiol, W. (2022). Dual functionality of *Trichoderma*: Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and biostimulant of cotton plants. *Front. Plant Sci.*, 13, 983127. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983127>.
 28. Пиляк, Н. В., & Нікіпелова, О. М. (2022). Визначення перспективних мікроорганізмів для створення комплексних препаратів інсекто-фунгіцидної дії. У Л. А. Янсе, О. М. Нікіпелова, В. П. Ярошевський, А. Д. Барабаш, І. С. Чернова, В. Г. Соловйова (Ред.), *Біологічний метод захисту рослин: досягнення і перспективи. ІТІ «Біотехніка» НААН. № 1.* (с. 70–73). Одеса: Видавництво НААН України. URL: <https://biotekhnika.od.ua/uk/diialnist/publikatsii/189-materialy-mizhnar-naukkonf-odesa-4-5-zhovtnia-2022-r>.
 29. Jain, A., Singh, A., Singh, S., Singh H. B. (2015b). Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *J. Basic Microbiol.*, 55, 961–972. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201400628>.
 30. Liu, H., Li, T., Li, Y., Wang, X., & Chen, J. (2022). Effects of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 on the Biocontrol of Wheat Head Blight. *Journal of fungi*, 8(12), 1250. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8121250>.
 31. Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., & Chen, J. (2018). Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial cell factories*, 17(1), 155. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1004-x>.
 32. Colak-Ates, A. (2019). Effect of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma harzianum* in the biological control of white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Appl Ecol Enviro Res*, 17(6), 15687–15701. DOI: https://doi.org/10.15666/aecer/1706_1568715701.

Стаття надійшла до редакції журналу 24.11.2024