

Дослідження культуральних особливостей та фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales, Ascomycota*) – вперше виявленого на промислових культурах печериці в Україні збудника павутинної цвілі

Дмитро Г. МЕДВЕДЕВ¹, Аліна О. КЕРНЕР², Світлана В. БОНДАРУК², Галєб А. АЛЬ-МААЛІ¹

¹ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська 2, Київ 01604, Україна

² Національний університет харчових біотехнологій та екологічного контролю
вул. Володимирська 68, Київ 01601, Україна
galeb.almaali@gmail.com

Medvediev D.G.¹, Kerner A.O.², Bondaruk S.V.², Al-Maali G.A.¹ 2019. Investigation of cultural features and fungicide resistance of the strains of *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales, Ascomycota*), a causal agent of cobweb disease on button mushroom crops, newly recorded in Ukraine. *Ukrainian Botanical Journal*, 76(2): 121–131.

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01001, Ukraine

² National University of Food Biotechnology and Environmental Control
68 Volodymyrska Str., Kyiv 01004, Ukraine

Abstract. For the first time, *Cladobotryum mycophilum*, a causal agent of cobweb disease of *Agaricus bisporus*, was discovered on mushroom farms in Ukraine. Growth characteristics and morphology features of five strains of *C. mycophilum* were studied on standard nutrient media of different composition. Particular attention was paid to determining the sensitivity of these strains to the following fungicides: benzimidazole fungicides (carbendazim and benomyl), fluazinam, metrafenone and prochloraz. In the study, we used concentrations recommended by manufacturers for application on mushroom farms. It was found that all strains were resistant to carbendazim. Only one strain had a high sensitivity to benomyl, two strains had a very low sensitivity, and two strains were resistant. Resistance to benzimidazole fungicides and absence of camphor odor are characteristic of *C. mycophilum* Type II. Prochloraz, which is the most common alternative to benzimidazole fungicides, inhibited the growth of two strains only. Investigation of the influence of these fungicides on micromorphology of *C. mycophilum* demonstrated that benzimidazole fungicides and prochloraz do not inhibit sporulation. Metrofenone, a new highly selective fungicide, inhibited the growth of all strains. Only one strain had a low sensitivity to this fungicide. Metrafenone significantly changed the mycelium micromorphology of *C. mycophilum*: the average thickness of hyphae was reduced by half, with respect to control in a medium without fungicides; the cytoplasm contained numerous inclusions, while conidia and conidiophores were absent. Fluazinam inhibited the growth of all these strains. Hypertrophy of vegetative cells, enlarged deformed conidiophores and conidiogenous cells were observed on the medium with fluazinam. Numerous cells had large vacuoles that occupy up to 70% of the cells. Fluazinam, like metrafenone, completely blocked sporulation of *C. mycophilum*.

Keywords: *Agaricus bisporus*, benzimidazole fungicides, cobweb disease, fluazinam, metrafenone, prochloraz

Медведєв Д.Г., Кернер А.О., Бондарук С.В., Аль-Маалі Г.А. 2019. Дослідження культуральних особливостей та фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales, Ascomycota*) – вперше виявленого на промислових культурах печериці в Україні збудника павутинної цвілі. *Український ботанічний журнал*, 76(2): 121–131.

Резюме. Вперше в грибних господарствах України було виявлено *Cladobotryum mycophilum*, збудника павутинної цвілі – небезпечної хвороби *Agaricus bisporus*. Вивчено характеристики росту та морфологічні ознаки п'яти штамів *C. mycophilum* на стандартних живильних середовищах різного складу. Особливу увагу було приділено визначенню чутливості штамів до фунгіцидів з різними активними речовинами: карбендазім і беномил (бензімідазолні фунгіциди), флуазинам, метрафенон і прохлораз. У дослідженні використовували концентрації, рекомендовані виробниками для застосування на грибних фермах. Виявлено, що всі досліджені штами були стійкими до карбендазіму; до бенамілу один мав високу чутливість, два – дуже низьку чутливість і два – були стійкими. Стійкість до бензімідазолних фунгіцидів і відсутність запаху камфори, відмічені у всіх досліджених штамів, визначають їхню приналежність до *C. mycophilum* Type II. Прохлораз, який є найпоширенішою альтернативою бензімідазолним фунгіцидам, пригнічував зростання лише двох штамів. Дослідження впливу цих фунгіцидів на мікроморфологію *C. mycophilum* виявило, що бензімідазолні фунгіциди й прохлораз не пригнічують споруляції. Метрофенон пригнічував ріст всіх штамів, й тільки один штам мав низьку чутливість до нього. Метрафенон суттєво змінював мікроморфологію міцелію *C. mycophilum*: середня товщина гіф зменшувалася вдвічі по відношенню до контролю, окремі гіфи містили численні гранули, конідії й конідіоносії не утворювались. Флуазинам пригнічував ріст всіх досліджених штамів. На середовищі з флуазинамом спостерігалася гіпертрофія вегетативних клітин, збільшені й деформовані конідіоносії та конідіогенні клітини; багато клітин мали великі вакуолі, які займали до 70% простору клітини. Флуазинам, як і метрафенон, повністю блокував спороутворення в *C. mycophilum*.

Ключові слова: *Agaricus bisporus*, бензімідазолні фунгіциди, метрафенон, павутинна цвіль, прохлораз, флуазинам

© 2019 Д.Г. Медведєв, А.О. Кернер, С.В. Бондарук, Г.А. Аль-Маалі

Вступ

Agaricus bisporus (J.E.Lange) Imdach — один з найбільш поширених культивованих видів їстівних грибів у світі. Загалом, кілька мікофільних видів грибів з родів *Hypomyces* (Fr.) Tul. & C.Tul., *Verticillium* Nees, *Trichoderma* Pers., *Neurospora* Shear & B.O.Dodge та *Penicillium* Link у процесі розвитку в компості або на поверхні карпофорів викликають різні захворювання печериці при промисловому виробництві (Fletcher, Gaze, 2007). Численні види роду *Hypomyces*, що утворюють анаморфи роду *Cladobotryum* Nees, уражують *A. bisporus* та викликають хворобу, відому як павутинна цвіль. Починаючи з середини 1990-х років види роду *Cladobotryum* перестали бути рідкісними збудниками захворювань печериць, а хвороба, викликана цими збудниками, набула характеру епідемії (Fletcher, Gaze, 2007; Carrasco et al., 2017). Наразі види роду *Cladobotryum* спричинюють значні збитки в умовах промислового виробництва *A. bisporus*. Втрати врожаю печериці в різних країнах становлять 28–40% (Seth, Dar, 1989; Bhatt, Singh, 1992; Ozaktan, Bora, 2000; Adie et al., 2006; Carrasco et al., 2017). Історично склалось, що павутинна цвіль у першу чергу асоціюється з *C. dendroides* (Bull.) W.Gams & Hooz., проте, на сьогодні накопичились відомості про те, що *C. varium* Nees, *C. multiseptatum* de Hoog, *C. verticillatum* (Link) S.Hughes та особливо *C. mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz. також є збудниками цієї хвороби, як в *A. bisporus*, так і в інших широко культивованих видів їстівних грибів (Carrasco et al., 2017).

Упродовж багатьох років вважали, що збудником павутинної цвилі на карпофорах *A. bisporus* в умовах грибних господарств на території України є *Cladobotryum dendroides* (= *Dactylium dendroides* (Bull.) Fr.). Проте існують численні свідчення, що протягом останніх 20 років ситуація в різних країнах світу докорінно змінилась, і основним патогеном, що викликає це захворювання, виявився інший вид — *C. mycophilum*. Так, Гарет МакКай зі співавторами (McKay et al., 1999) за допомогою молекулярних маркерів проаналізували 34 штами, які були попередньо визначені як *C. dendroides*. Вони були зібрані дослідниками в грибних господарствах Ірландії, Великої Британії, Бельгії, Нідерландів, Люксембургу, Німеччини, Канади, США та депоновані в національні колекції культур мікопатогенних грибів. У результаті молекулярно-

генетичного дослідження, проведеного авторами, було встановлено, що лише три штами з цього списку насправді належать до *C. dendroides*, а 31 штам перевизначено як *C. mycophilum* (McKay et al., 1999). Схожа ситуація з поширенням *C. mycophilum* виявилась і в інших країнах. Так, вчені з Кореї та Іспанії у двох незалежних дослідженнях встановили, що основним збудником, який викликає павутинну цвіль у цих країнах, є саме *C. mycophilum*, а не *C. dendroides*, як вважалося раніше (Back et al., 2010, 2012; Gea et al., 2011). Зазначимо, що подібні помилкові визначення, можливо, пов'язані з кількома причинами: по-перше, ці види мають однакову морфологію колоній та не відрізняються за розміром та формою конідій (проте мають різний спосіб утворення конідій); по-друге, авторитетні дослідники роду *Cladobotryum* відмічали, що *C. mycophilum* не асоційований з *A. bisporus* (Rogerson, Samuels, 1994).

Зазначимо, що поширення *C. mycophilum*, яке супроводжується скороченням частоти трапляння *C. dendroides* у грибних господарствах, з великою вірогідністю пов'язано з широким використанням бензімідазольних фунгіцидів (McKay et al., 1999).

Враховуючи вищенаведене, нами були поставлені такі цілі: дослідити поширення *C. mycophilum* у спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць, з'ясувати культуральні особливості досліджуваних ізолятів *C. mycophilum* на різних живильних середовищах та встановити стійкість штамів *C. mycophilum* до різних фунгіцидів.

Матеріали та методи

Ізоляція та визначення чистих культур. Уражені павутинною цвиллю плоді тіла *A. bisporus* були зібрані впродовж 2016–2017 рр. у п'яти спеціалізованих промислових господарствах із вирощування печериць у різних областях України (табл. 1). У лабораторних умовах з цих плодів тіл відокремлювали частини тканини з ознаками ураження *Cladobotryum* spp. та переносили їх на стерильне живильне середовище МЕА (мальц екстракт агар) з антибіотиком. Інкубацію чашок Петрі проводили при температурі 18 ± 1 °C упродовж 3–4 діб до появи міцелію з характерними для *Cladobotryum* spp. ознаками. Отриману чисту культуру переносили на середовище МЕА (Pronadisa, Іспанія) для подальшої ідентифікації (de Hoog, 1978; Rogerson, Samuels, 1994; Tamm, Põldmaa, 2013). Мікроскопічні дослідження

Таблиця 1. Місця та дати відбору матеріалу для ізоляції чистих культур різних штамів *Cladobotryum mycophilum*

Table 1. Places and dates of material selection for the isolation of pure cultures of various strains of *Cladobotryum mycophilum*

Штам	Місця розташування промислових господарств	Дата відбору матеріалу
№ 4	м. Маріуполь, Донецька обл.	23.06.2016
№ 6	м. Суми	03.05.2017
№ 7	с. Долинське, Запорізька обл.	23.05.2017
№ 8	с. Олександрівка-Калинове, Донецька обл.	17.07.2017
№ 10	с. Сергіївка, Запорізька обл.	15.09.2017

здійснювали на світловому мікроскопі марки Zeiss (Німеччина). Мікропрепарати готували в 3%-му розчині КОН. Культури грибів роду *Cladobotryum*, ідентифіковані як *C. mycophilum*, використовували в подальшому дослідженні.

У дослідженнях з визначення характерних для окремих штамів морфологічних ознак та швидкості росту цих штамів використовували такі середовища: 1) глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25, дріжджовий екстракт – 3, пептон – 3, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,25, агар – 20; 2) MEA (Pronadisa, Іспанія); 3) Чапека (Biolife Italiana S.r.l., Італія). Культивування міцелію проводили при $25 \pm 1^\circ C$.

Швидкість росту вимірювали за формулою (Bisko et al., 2012):

$$V = (R_2 - R_1) / (t_2 - t_1),$$

де V – швидкість росту, мм/доба; R_1 – радіус колонії на час t_1 ; R_2 – радіус колонії на час t_2 .

Чутливість до фунгіцидів. У дослідженні використовували найбільш поширені у вітчизняному грибовництві фунгіцидні препарати – флуазинам, метрафенон, карбендазим, прохлораз та беномил, основні характеристики яких представлені в табл. 2. Для визначення чутливості ізолятів до фунгіцидів використовували ГПДА-

середовище, що обумовлено високою швидкістю росту на ньому всіх досліджених штамів. Вивчення стійкості різних штамів *C. mycophilum* до фунгіцидів вивчали за допомогою модифікованого дифузійного методу. Блоки з фунгіцидами виготовляли шляхом агаризації стерильного розчину препарату; з полімеризованого таким чином середовища стерильно вирізали блоки діаметром 5 мм і висотою 3 мм. Вміст фунгіцидів у блоках дорівнював максимальній дозі, рекомендованій для виробництва печериць (табл. 2). Блоки з фунгіцидом розміщували на поверхні ГПДА-середовища на відстані 20–25 мм від інокулюма досліджуваного штаму. В одній чашці розміщували не більше двох блоків з одним препаратом. Інокуляцію проводили, використовуючи споривий матеріал, який наносили на задану точку на поверхні агаризованого середовища методом проколу. Культивування проводили при $25 \pm 1^\circ C$. Зону інгібування вимірювали на момент повного припинення росту міцелію, що для всіх штамів відбувалося на 7 добу культивування. В зв'язку з тим, що зона інгібування не завжди мала правильну округлу форму, її розміри обчислювали за площею (cm^2), застосовуючи програми ImageJ. Штам вважали чутливим, якщо середнє значення зони інгібування було понад $2 cm^2$ (що відповідає середньому діаметру зони 16 мм); помірно стійким – якщо вона була більшою за $1,5 cm^2$ і меншою, ніж $2 cm^2$ (що відповідає діапазону діаметрів 14–16 мм); якщо розмір зони не перевищував $1,5 cm^2$ (діаметр менше 14 мм), штам вважали стійким до відповідного фунгіциду. Зону інгібування визначали як таку, в якій не спостерігалось жодних ознак росту міцелію. Зону пригнічення визначали як таку при наявності зміненої, по відношенню до контролю, морфології колонії.

Таблиця 2. Характеристики використаних у дослідженні фунгіцидів

Table 2. Characteristics of fungicides used in the study

Характеристики	Фунгіцид (активна речовина)				
	флуазинам	метрафенон	прохлораз	карбендазим	беномил
Комерційна назва	Ширлан	Флексіті	Споргон	Дерозал	Фундазол
Виробник	Syngenta, Швейцарія	BASF, Німеччина	BASF, Німеччина	Bayer, Німеччина	Agro-Chemie Ltd, Угорщина
Препаративна форма	суспензія	суспензія	порошок	суспензія	порошок
Тип діючої речовини	арілоамінопередін	бензофенон	імідазол	бензимидазол	
Вміст діючої речовини	500 г/л	300 г/л	450 г/кг	500 г/л	500 г/кг
Рекомендована доза фунгіциду*	0,125 г/л	0,9 г/л	1,35 г/л	1,5 г/л	1,5 г/л

*Рекомендована виробником доза для застосування в грибовництві подана в перерахунку на діючі речовини

У випадках, коли фіксували інгібуючу дію фунгіцидів на ріст *C. mycophilum*, проводили додаткові дослідження впливу фунгіцидів на мікроморфологію. В зазначеному експерименті фунгіциди в максимальних рекомендованих дозах додавали безпосередньо до ГПДА-середовища, використовуючи фільтри для стерильної фільтрації з розміром пор 0,2 мкм (Filtres Fioroni, Китай). Фунгіциди додавали в розплавлене (50 °C) агаризоване середовище та швидко розливали по чашках Петрі з метою уникнення термічного розкладу препарату. Культивували досліджувані штами грибів на середовищах з фунгіцидами при 25 ± 1 °C.

Всі досліди проводили у 3–6 повторностях, статистичну обробку даних – у програмі *Statistica 10*.

Результати та обговорення

Усі п'ять відібраних штамів збудника павутинної цвілі були нами ідентифіковані як такі, що належать до виду *C. mycophilum*. Всі штами мали характерні для зазначеного виду ознаки (de Hoog, 1978; Rogerson, Samuels, 1994), а саме: колонії на МЕА-середовищі швидкозростаючі, широко розпростерті, міцелій рясний, бавовняний, реверзум колоній забарвлений у рожевий та червоний кольори. Конідієносці довгі нерозгалужені, нерівномірно розгалужені або вертицилятно розгалужені; конідіогенні клітини довжиною 30–37 мкм, шириною 3,5–5,3 мкм. Конідії $15\text{--}32 \times 5\text{--}7$ мкм циліндричні або еліпсоїдні несептовані, або мають одну–дві перетинки. Характерною ознакою *C. mycophilum*, що відрізняє його від подібного *C. dendroides*, є ретрогресивний конідіогенез і наявність спор із широким базальним рубцем (Tamm, Pöldmaa, 2013).

Раніше повідомлялося про знаходження на території України цього виду на плодкових тілах *Pleurotus* sp., *Inocybe geophylla* (Fr.) P.Kumm. та на рештках неідентифікованих базидієвих грибів з території Харківської області (Prylutskiy et al., 2017). Проте ці знахідки були зроблені у природних екосистемах. Зазначимо, що дотепер не повідомлялося про поширення даного мікопатогена в спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць, однак, враховуючи його глобальне поширення в грибних господарствах у світі, цього слід було очікувати.

Підприємства з вирощування печериць обстежувались упродовж усього року, але всі виявлені

штами *C. mycophilum* виділені з уражених карпофоров *A. bisporus*, які були зібрані лише у травні–вересні, що свідчить про приуроченість розвитку *C. mycophilum* до теплих місяців. Це підтверджують літературні дані, в яких зазначається, що тепла й волога погода стимулює розвиток павутинної цвілі в господарствах з вирощування печериць (Vedder, 1978).

Характеристика росту та морфології колоній на стандартних живильних середовищах. Усі досліджені штами *C. mycophilum* мали неоднакову швидкість росту на живильних середовищах різного складу (рис. 1). Всі штами *C. mycophilum* мали високу швидкість росту на середовищі ГПДА: від 14 мм на добу (штам № 7) до 20 мм (штам № 10). Три штами № 6, 7 та 8 мали однакову (у межах статистичної похибки) швидкість росту на середовищах ГПДА та МЕА. В цілому швидкість росту штамів *C. mycophilum* на середовищі МЕА повністю відповідала значенням, що були отримані іншими дослідниками за аналогічних умов (Grogan, 2000).

Більшість штамів на середовищі Чапека росли значно повільніше, ніж на інших середовищах. Виключенням був штам № 7, швидкість росту якого на цьому середовищі дорівнювала швидкості росту на МЕА.

Суттєвою була й різниця в морфології колоній на різних середовищах. Міцелій *C. mycophilum* на ГПДА-середовищі відрізнявся високою щільністю, а повітряний міцелій мав характерну неоднорідну структуру, сформовану пучками високих розгалужених конідієносців. Колонії всіх штамів на зазначеному середовищі були забарвлені в жовто-солом'яний колір, за винятком краю, який був білим. Жовте забарвлення міцелію з'являлося на 4–5 добу культивування. Реверзум колонії на 3–4 добу набував яскраво-жовтого забарвлення, яке згодом змінювалось на коричневе, а на 6–7 добу – на яскраво-рожеве та червоне.

На середовищі МЕА міцелій всіх штамів був білий або кольору слонов'ячої кістки та мав неоднорідну структуру з вираженою радіальною концентричністю. Реверзум колонії на 3–5 добу набував яскраво-жовтого кольору, а на 7–9 добу – рожевого та червоного. Зазначимо, що на відміну від ГПДА-середовища, рожевий колір на МЕА-середовищі був значно світлішим, власне забарвлення реверзума рожевим пігментом було нерівномірним, а проміжна стадія, на якому

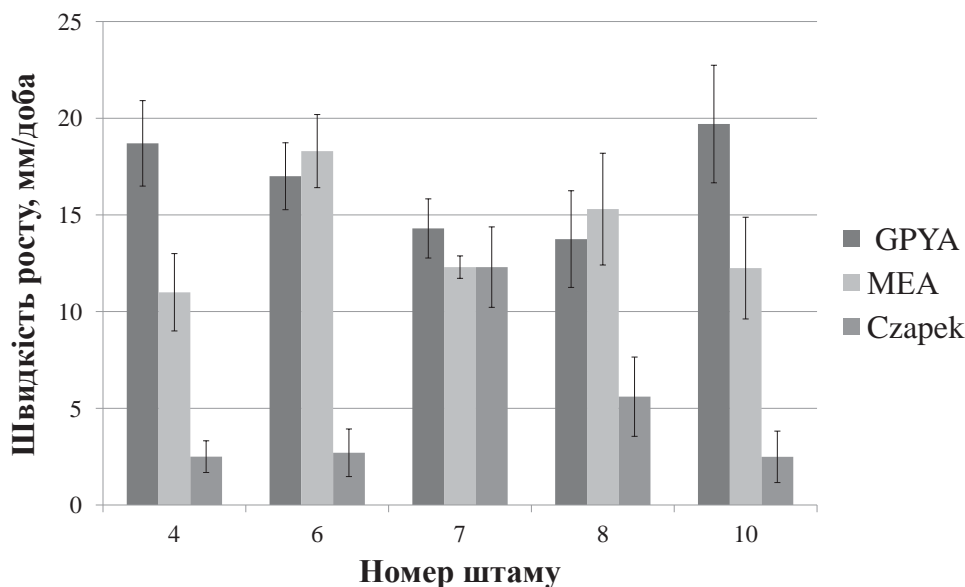


Рис. 1. Швидкість росту штамів *Cladobotryum mycophilum* на різних живильних середовищах: GPYA (ГПДА – глюкозо-пептон-дріжджовий агар), MEA (мальць екстракт агар) та Czapek (середовище Чапека) ($x \pm SE$)

Fig. 1. Growth rate of *Cladobotryum mycophilum* strains on different nutrient media: GPYA (glucose-peptone-yeast agar), MEA (malt extract agar) та Czapek (Czapek medium) ($x \pm SE$)

реверзум мав коричневе забарвлення, на MEA-середовищі була відсутня.

На середовищі Чапека міцелій всіх штамів без виключення був набагато менш щільним, ніж на середовищах ГПДА та MEA. Міцелій всіх штамів мав білий колір, крім штаму № 4, який був солом'яного кольору. Пігментація реверзumu в різних штамів мала індивідуальні риси. Реверзум колонії штаму № 4 на 3 добу був жовтим, а на 5 добу мав темно-зелене забарвлення, яке поширювалось від центру по мірі культивування, при цьому зона росту колонії залишалась жовтою. У штамів № 6, 8 та 10 жовтий колір з'являвся на 5 добу експерименту. В цих штамів реверзум залишався жовтим упродовж всього періоду культивування. Край реверзumu штаму № 7 на 3 добу культивування набував темно-зелено-коричневого кольору, на наступну добу в центрі колонії з'являлося рожеве забарвлення. Наприкінці культивування реверзум колонії зазначеного штаму мав концентричні зони, забарвлені в рожевий, жовтий та оливково-зелений кольори.

Отримані результати свідчать про те, що кожен штам *C. mycophilum* має індивідуальні біологічні особливості, які проявляються в морфології колонії

та швидкості росту на живильних середовищах з неорганічним та органічним джерелами азоту.

Стійкість до фунгіцидів. Факт виявлення в грибних господарствах України нового мікопатогенного гриба *C. mycophilum* гостро ставить питання про використання й підбір оптимальних фунгіцидів для боротьби з ним та стримування поширення інфекції на сусідні господарства. Основні заходи боротьби з павутинною цвілью були розроблені ще в 1980-х рр. і спрямовані в першу чергу на боротьбу з найбільш поширеним у той час *C. dendroides* (Fletcher et al., 1986). Основними рекомендованими фунгіцидами були препарати бензimidазольної природи. Хоча багато досліджень прямо вказує на те, що значна кількість штамів *C. mycophilum* мають резистентність до цих сполук (McKay et al., 1999), частина новітніх видань, призначених для технологів грибних господарств (Fletcher, Gaze, 2007), та ряд наукових досліджень, присвячених фунгіцидній резистентності *C. mycophilum* (Kim et al., 2014), рекомендують бензimidазольні фунгіциди для боротьби з павутинною цвілью, збудником якої є цей гриб. Наукові відомості свідчать про наявність у грибних господарствах світу штамів *C. mycophilum* з різною стійкістю

Таблиця 3. Вплив фунгіцидів на ріст штамів *Cladobotryum mycophilum* у дослідях *in vitro* на ГПДА-середовищі ($x \pm SE$)Table 3. Influence of fungicides on growth of *Cladobotryum mycophilum* strains *in vitro* on GPYA-medium ($x \pm SE$)

Номер штаму	Зона інгібування росту міцелію, см ²				
	флуазинам	метрафенон	прохлораз	карбендазим	беномил
№ 4	6,87 ± 1,16 ^ч	4,65 ± 1,41 ^ч	0 ^с	0 ^с	0 ^с
№ 6	4,31 ± 1,0 ^ч	16,68 ± 2,3 ^ч	0 ^с	0 ^с	0 ^с
№ 7	10,20 ± 2,13 ^ч	1,71 ± 0,23 ^{пс}	0 ^с	0 ^с	2,49 ± 0,37 ^{пс}
№ 8	6,87 ± 1,54 ^ч	8,34 ± 1,76 ^ч	19,86 ± 2,2 ^ч	0 ^с	2,1 ± 0,35 ^{пс}
№ 10	7,12 ± 1,91 ^ч	15,66 ± 1,9 ^ч	45,45 ± 3,7 ^ч	0 ^с	9,27 ± 2,4 ^ч

ч – чутливий до відповідного фунгіциду штам; пс – помірно стійкий до відповідного фунгіциду штам; с – стійкий до відповідного фунгіциду штам.

до фунгіцидів, що прямо вказує на необхідність дослідження їхньої резистентності в Україні.

При дослідженні стійкості до фунгіцидів штамів *C. mycophilum*, виділених в українських грибних господарствах, нами були використані фунгіциди як бензімідазольного ряду (карбендазим та беномил), так і фунгіциди іншої хімічної природи (флуазинам, метрафенон, прохлораз), що широко застосовуються у вітчизняній грибній індустрії. Дію всіх фунгіцидів вивчали при максимальній концентрації, рекомендованій виробникам. Обрання такої моделі досліду обґрунтовується особливостями використання фунгіцидів у господарствах. Як показують наші власні спостереження, виробники грибів застосовують фунгіцидні препарати саме у найвищих дозволених концентраціях з метою зниження ризиків прояву стійкості до менших концентрацій препарату. Отже, якщо досліджений фунгіцид не ефективний за максимальної концентрації, то вивчення дії більш високих доз не є доцільним, оскільки використання таких доз у грибному господарстві буде прямим порушенням санітарно-гігієнічних норм.

Результати досліду з вивчення стійкості різних штамів *C. mycophilum*, виявлених в українських грибних господарствах, представлені в табл. 3.

Бензімідазольні фунгіциди. В ході експерименту було з'ясовано, що всі досліджені штами виявилися стійкими до карбендазиму, який належить до бензімідазольних фунгіцидів. Другий використаний у дослідженні фунгіцид цього класу – беномил суттєво інгібував ріст лише штаму № 10, а ріст штамів № 7 та № 8 стримував значно менше. Проте навколо блоків з фунгіцидами (беномилом або карбендазимом) у всіх штамів спостерігали зону, яка характеризувалась незначними змінами у морфології колонії:

щільність міцелію була меншою, а реверзум колонії відповідної зони був світлим. Ці зони можна трактувати, як зони пригнічення. В цілому діаметр зазначених зон становив близько 6 мм.

Прохлораз інгібував ріст двох штамів – № 8 та № 10. Останній штам виявився особливо чутливим до дії прохлоразу. Проте, відмітимо значні зміни в морфології міцелію у всіх штамів відносно контролю без фунгіцидів: загальна щільність колонії була значно меншою, висота повітряного міцелію нижчою, а реверзум колонії був забарвлений неоднорідно у жовті, рожеві та вохряні зони та плями. Зазначені зміни не були локалізовані біля джерела фунгіциду, а поширювались на всю колонію. Таким чином, можна констатувати, що прохлораз досить сильно пригнічує навіть ті штами *C. mycophilum*, ріст яких він не інгібує.

Найефективнішими фунгіцидами були **флуазинам та метрафенон**. Найвразливішим до дії флуазинаму виявився штам № 7, найменш чутливим – штам № 4. Особливою ознакою дії цього фунгіциду було формування перед зоною інгібування додаткової зони пригнічення. Розмір цієї зони в середньому становив 5 мм, і вона складалась із щільного, притиснутого до середовища міцелію, забарвленого у жовтий колір; реверзум, що відповідав зоні пригнічення, мав темно-коричневе забарвлення та виразно світлий край на стику із зоною інгібування.

Метрафенон інгібував ріст 4 штамів. Особливо чутливими були штами № 6 та № 10. Штам № 7 був помірно стійким до дії цього фунгіциду. Міцелій на стику із зоною інгібування не формував чіткого краю з утворенням щільного міцелію, який ми спостерігали в дослідях з флуазинамом, навпаки, ця зона складалась з білого ватоподібного повітряного міцелію.

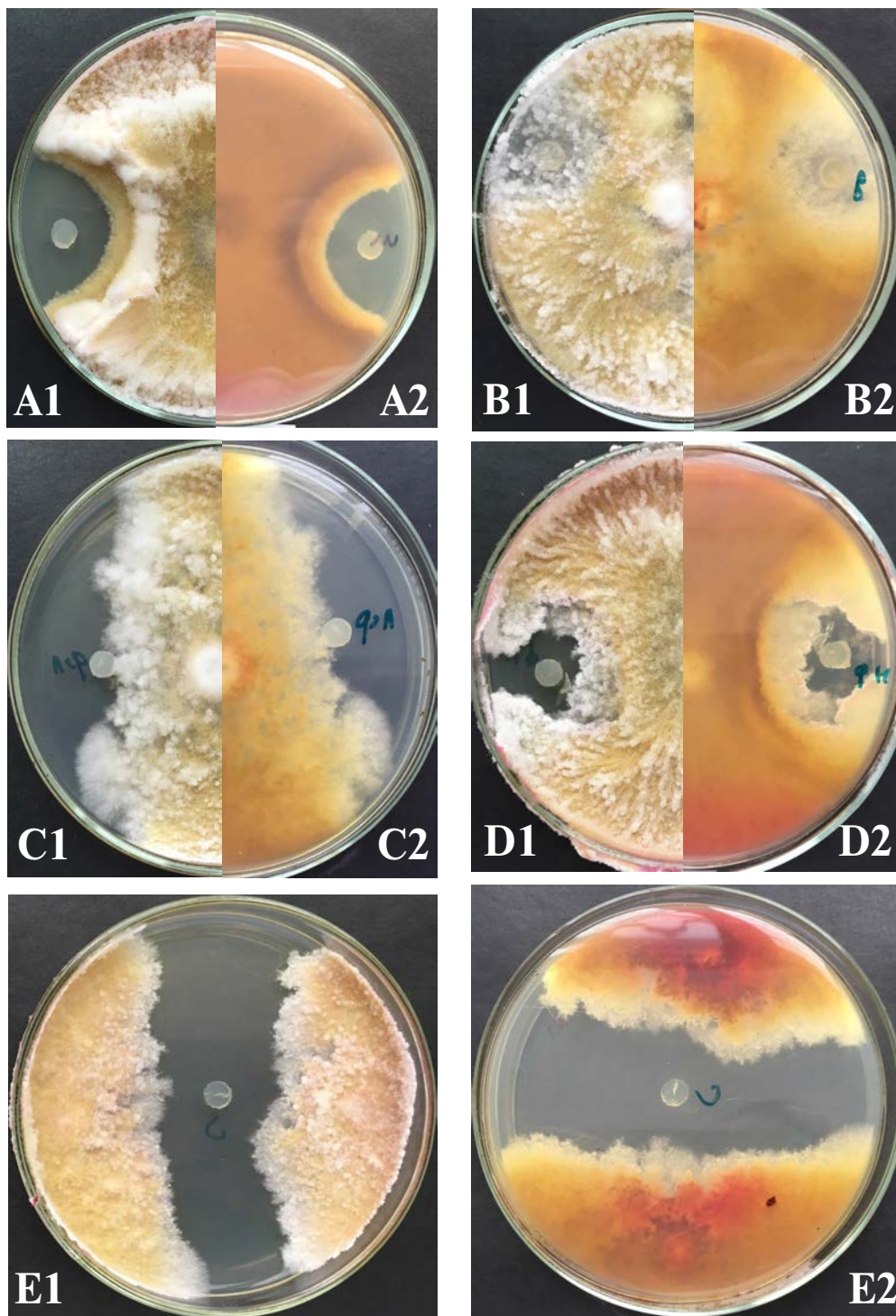


Рис. 2. Вплив різних фунгіцидів на ріст та морфологію колоній *Cladobotryum mycophilum*. А: флуазінам, штам № 6; тут і далі: 1 – загальний вид колонії; 2 – реверзум колонії; В: карбендазім, штам № 10; С: метрофенон, штам № 8; D: беномил, штам № 8; Е: прохлораз, штам № 8

Fig. 2. Influence of different fungicides on growth and morphology of *Cladobotryum mycophilum* colonies. A: fluazinam, strain No. 6; here and below: 1 – colony; 2 – reverse of the colony; B: carbendazim, strain No. 10; C: metrofenon, strain No. 8; D: benomyl, strain No. 8; E: prochloraz, strain No. 8

Також зазначимо, що за дії прохлоразу та метрафенону не формувалася типова кругова зона інгібування (рис. 2). Під впливом цих препаратів утворювалася "смуга" або асиметричний відносно джерела фунгіциду сектор інгібування.

Багато дослідників відносять штами зі стійкістю до бензимидазольних фунгіцидів до групи, яку прийнято позначати, як *C. mycophilum* Type II (McKay et al., 1999). Особливістю штамів цієї групи є відсутність характерного камфорного запаху, який продукують "класичні" культури штамів *C. mycophilum* Type I, і завдяки якому телеоморфа цього виду отримала свою назву *Hypomyces odoratus* G.R.W. Arnold. Раніше такі "не камфорні" штами помилково відносили до *C. dendroides* Type II (Grogan, 2000, 2006). Зазначимо, що всі п'ять штамів, виділені на українських грибних господарствах, не мали камфорного запаху та були стійкими до бензимидазольних фунгіцидів, особливо до карбендазиму, що дозволяє віднести їх до групи *C. mycophilum* Type II.

Відомі дослідження, спрямовані на пошук ефективних фунгіцидів для боротьби саме зі штамми *C. mycophilum* Type II. Основним із таких фунгіцидів є прохлораз, який у ряді країн є єдиною дозволеною законодавством до використання на грибних господарствах альтернативою бензимидазольним фунгіцидам (Grogan, 2000, 2006; Chakwiya et al., 2015). Дослідження південно-африканських, американських (Chakwiya et al., 2015), а також іспанських штамів (Carrasco et al., 2017) виявили, що в цілому вони більш чутливі до прохлоразу, ніж до бензимидазольних фунгіцидів. Проте, штами *C. mycophilum*, виділені з карпофорів *Pleurotus eryngii* на грибних господарствах Республіки Корея, були чутливішими до бензимидазольних фунгіцидів, ніж до прохлоразу (Kim et al., 2014). Але спеціалізація до іншого гриба-господаря певною мірою відокремлює ці штами від штамів, що інфікують *A. bisporus*. Результати нашого дослідження вказують на те, що принаймні два штами № 10 та № 8 були більш чутливими до прохлоразу, ніж до бензимидазольних фунгіцидів. Проте штами № 4 та № 6 були резистентними, як до двох досліджених бензимидазольних фунгіцидів (карбендазим та беномил), так і до прохлоразу (табл. 3).

Вивчення впливу зазначених бензимидазольних фунгіцидів та прохлоразу на мікроморфологію досліджених штамів не виявило суттєвих змін.

Навіть у випадках, коли ці фунгіциди інгібували ріст міцелію, утворювалися візуально повноцінні спороносні структури та спостерігалось рясне спороношення. Це свідчить про те, що прохлораз і бензимидазольні фунгіциди не можуть ефективно застосовуватися для боротьби зі штамми *C. mycophilum* Type II, які поширені в Україні.

Перспективною альтернативою прохлоразу та бензимидазольним фунгіцидам є новий препарат метрафенон (Opalski et al., 2006). Наразі існує лише обмежена кількість досліджень щодо впливу метрафенону на гриби роду *Cladobotryum*. Проте в них доведені безпечність використання та ефективність застосування цього препарату для боротьби з *C. mycophilum* (Puck et al., 2016; Carrasco et al., 2017). Так, група вчених під керівництвом J. Carrasco (2017), у досліді з вивчення резистентності іспанських штамів *C. mycophilum* до п'яти різних фунгіцидів встановила, що чутливість до метрафенону в зазначеного мікопатогена набагато більша, ніж до бензимидазольних фунгіцидів та прохлоразу. Крім того, метрафенон має найбільшу серед цих фунгіцидів селективність: у досліді *in vitro* *C. mycophilum* майже у 84 тисячі разів чутливіший до метрафенону, ніж *A. bisporus* (Carrasco et al., 2017).

Наші дослідження із впливу метрафенону на мікроморфологічні ознаки *C. mycophilum* виявили, що мікроморфологія вегетативного міцелію зазнала суттєвих змін: загальна товщина гіф зменшилася і становила 2,5–3,1 мкм (це значення для гіф міцелію на контрольному середовищі без додавання фунгіцидів становить $6,1 \pm 1,15$ мкм), а окремі гіфи містили численні гранули (рис. 3). Міцелій під впливом метрафенону був знебарвлений, утворення рожевого пігменту не спостерігалось, крім того, вегетативні гіфи не набували характерного рожевого забарвлення за дії 3%-го розчину КОН. Особливо важливо підкреслити, що зазначений препарат повністю пригнічував споруляцію *C. mycophilum*: конідії та конідиеносці не утворювалися.

Отримані нами результати вказують на перспективність використання метрафенону для боротьби з *C. mycophilum* на вітчизняних грибних господарствах. Але треба враховувати, що один зі штамів (№ 7) був помірно стійким.

Флуазинам, як зазначалось, інгібував ріст всіх досліджених штамів *C. mycophilum*. Основна проблема його застосування полягає в тому, що

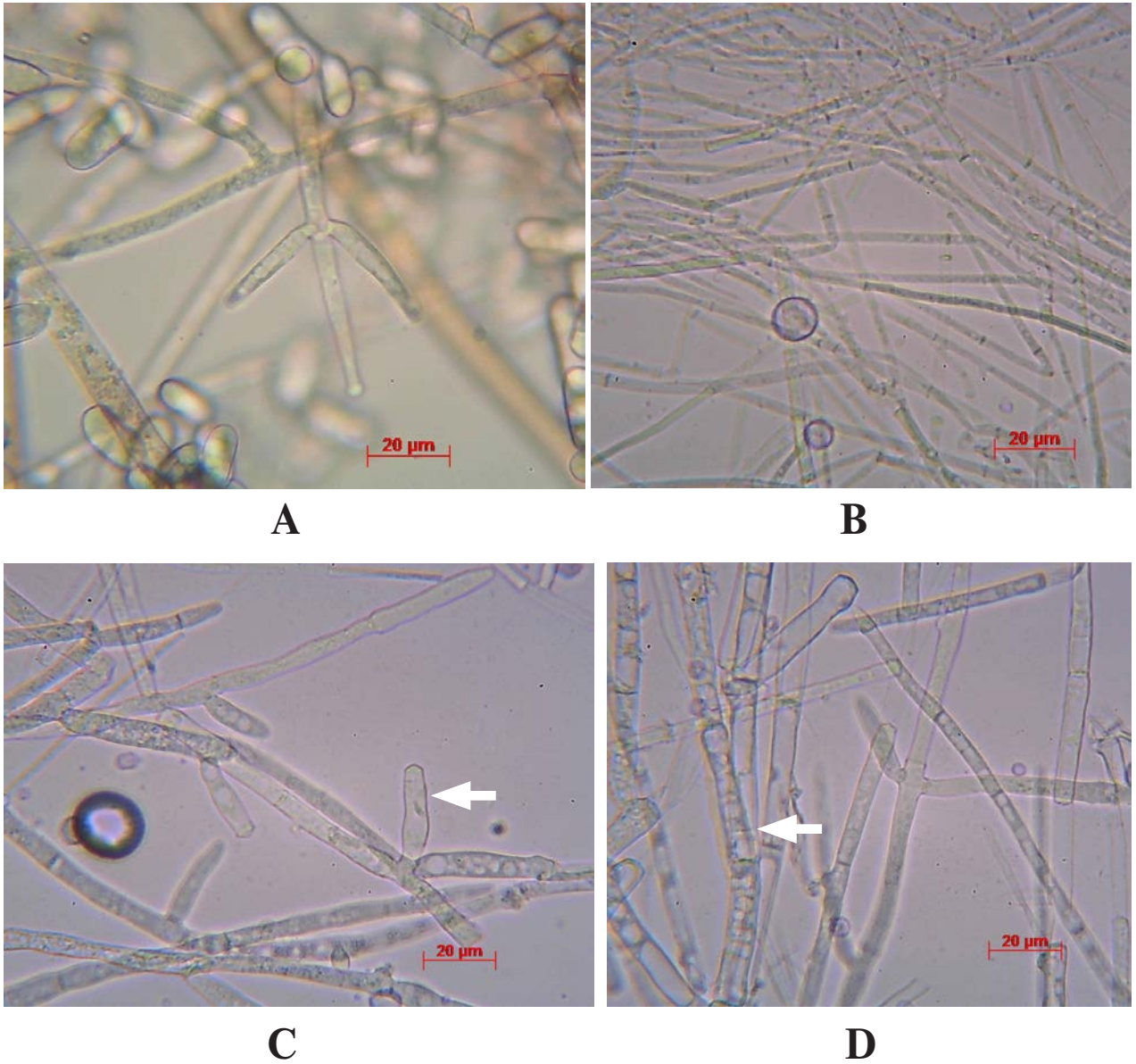


Рис. 3. Зміни у мікроморфології *Cladobotryum mycophilum* (штам № 10) під впливом фунгіцидів. А: контроль, без фунгіцидів; В: метрафенон; С та D: флуазинам. Стрілками позначено деформовані конідогенні клітини (С) та вакуолізовані ділянки (D)

Fig. 3. Influence of different fungicides on micromorphology of *Cladobotryum mycophilum* (strain No. 10):

A: control trial without fungicides; B: metrafenone; C and D: fluazinam.

Arrows indicate deformed conidiogenous cells (C) and vacuolized portions (D)

хоча виробники комерційних препаратів на основі флуазинаму рекомендують застосовувати його у грибівництві для захисту врожаю від мікопатогенних грибів, наукових публікацій з цього питання не існує. Проте, встановлена досить широка доказова база доцільності та безпечності використання цього фунгіциду в сільському господарстві для захисту зернових та овочевих культур від фітопатогенних грибів (Matheron, Porchas, 2004; Dai et al., 2018; Jeschke et al., 2019).

Нами показано, що за дії флуазинаму відбувалися суттєві зміни мікроморфологічних ознак міцелію штамів *C. mycophilum*. По-перше, це проявлялось у суттєвому збільшенні товщини гіф та утворенні великих вакуолізованих ділянок. По-друге, відбувалась деформація конідиеносців, яку супроводжувала гіпертрофія спороносних клітин. І по-третє, що дуже важливо, флуазинам повністю пригнічував спорутворення (рис. 3).

Висновки

Вперше в спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць виявлено небезпечний мікопатогенний гриб *C. mycophilum*. Виявлено штамові особливості п'яти ізолятів *C. mycophilum* по відношенню до різних типів живильного середовища та п'яти різних фунгіцидів. Отримані експериментальним шляхом дані показали, що більшість виявлених штамів *C. mycophilum* стійкі до бензимидазольних фунгіцидів та прохлоразу, проте чутливі до флуазинаму та метрафенону. Два останніх фунгіциди суттєво інгібують ріст міцелію *C. mycophilum* та повністю пригнічують спорутворення. Вважаємо доцільним рекомендувати застосовувати метрафенон та флуазинам для боротьби з *C. mycophilum* у грибних господарствах України за умов почергової зміни препаратів з метою зниження вірогідності утворення резистентних до фунгіцидів штамів-збудників павутинної гнилі.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Adie B., Grogan H., Archer S., Mills P. 2006. Temporal and spatial dispersal of *Cladobotryum* conidia in the controlled environment of a mushroom growing room. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7212–7217. <https://doi.org/10.1128/AEM.01369-06>
- Back C.-G., Kim² Y.-H., Jo W.-S., Chung H., Jung H.-Y. 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, 76(3): 232–235. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0236-3>
- Back C.-G., Lee C.-Y., Seo G.-C., Jung H.-Y. 2012. Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea. *Mycobiology*, 40(3): 189–194. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.189>
- Bhatt N., Singh R.P. 1992. Cobweb disease of *Agaricus bisporus*: incidence, losses and effective management. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 22(2): 178–181.
- Bisko N.A., Babitskaya V.G., Buchalo A.S., Krupoderova T.A., Lomberg M.L., Mikchaylova O.B., Puchkova T.A., Solomko E.F., Shcherba V.V. 2012. *Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh makromisetov v kulture: Sbornik nauchnykh trudov*, vol. 2. Ed. S.P. Wasser. Kiev, 459 pp. [Бисько Н.А., Бабицкая В.Г., Бухало А.С., Круподерова Т.А., Ломберг М.Л., Михайлова О.Б., Пучкова Т.А., Соломко Э.Ф., Щерба В.В. 2012. *Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сб. науч. трудов*, т. 2. Ред С.П. Вассер. Киев, 459 с.]
- Carrasco J., Navarro M.J., Santos M., Gea F.J. 2017. Effect of five fungicides with different modes of action on cobweb disease (*Cladobotryum mycophilum*) and mushroom yield. *Annals of Applied Biology*, 171(1): 62–69. <https://doi.org/10.1111/aab.12352>
- Carrasco J., Navarro M.J., Gea F.J. 2017. Cobweb, a serious pathology in mushroom crops: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15: e10R01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2017152-10143>
- Chakwiya A., Van der Linde E.J., Korsten L. 2015. In vitro sensitivity testing of *Cladobotryum mycophilum* to carbendazim and prochloraz manganese. *South African Journal of Science*, 111(11–12): 1–7. <http://doi.org/10.17159/sajs.2015/20140408>
- Dai Y., Gan L., Ruan H., Shi N., Du Y., Liao L., Wei Z., Teng Z., Chen F., Yang X. 2018. Sensitivity of *Cochliobolus heterostrophus* to three demethylation inhibitor fungicides, propiconazole, diniconazole and prochloraz, and their efficacy against southern corn leaf blight in Fujian province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2): 447–459. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1490-z>
- de Hoog G.S. 1978. Notes on some fungicolous hyphomycetes and their relatives. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 10(1): 33–81.
- Fletcher J.T., White P F., Gaze R.H. 1986. *Mushrooms pest and disease control*. Ponteland: Intercept, 156 pp.
- Fletcher J.T., Gaze R.H. 2007. *Mushroom Pest and Disease Control: A Colour Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 192 pp.
- Gea F.J., Navarro M.J., Suz L.M. 2011. First report of *Cladobotryum mycophilum* causing cobweb on cultivated king oyster mushroom in Spain. *Plant Disease*, 95(8): 1030–1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0255>
- Grogan H.M. 2000. Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104(3): 357–364. <http://doi.org/10.1017/S0953756299001197>

- Grogan H. M. 2006. Fungicide control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum* strains with different benzimidazole resistance profiles. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)*, 62(2): 153–161. <https://doi.org/10.1002/ps.1133>
- Jeschke P., Witschel M., Krämer W., Schirmer U. 2019. *Modern crop protection compounds*. Wiley-VCH, 1776 pp.
- Kim M.K., Seuk S.W., Lee Y.H., Kim H.R., Cho K.M. 2014. Fungicide sensitivity and characterization of cobweb disease on a *Pleurotus eryngii* mushroom crop caused by *Cladobotryum mycophilum*. *The Plant Pathology Journal*, 30(1): 82. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2013.0098>
- Matheron M.E., Porchas M. 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease*, 88(6): 665–668. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.665>
- McKay G.J., Egan D., Morris E., Scott C., Brown A.E. 1999. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2): 606–610.
- Opalski K.S., Tresch S., Karl-Heinz Kogel K.-H., Grossmann K., Kohle H., Huckelhoven R. 2006. Metrafenone: studies on the mode of action of a novel cereal powdery mildew fungicide. *Pest Management Science (formerly Pesticide Science)*, 62(5): 393–401. <https://doi.org/10.1002/ps.1176>
- Ozaktan H., Bora T. 2000. Biological control of some important mushroom diseases in Turkey by fluorescent pseudomonads. In: *Science and cultivation of edible fungi*, vol. 2. Ed. L.J.L.D. Van Griensven. Rotterdam: A.A. Balkema, pp. 689–694.
- Prylutskyi O.V., Akulov O.Yu., Leontyev D.V., Ordinet A.V., Yatsiuk I.I., Usichenko A.S., Savchenko A.O. 2017. Fungi and fungus-like organisms of Homilsha Forests National Park, Ukraine. *Mycotaxon*, 132(3): 705.
- Pyck N., Sedeyn P., Demeulemeester M., Grogan H. 2016. Evaluation of metrafenone against *Verticillium* and *Cladobotryum* spp. – causal agents of dry bubble and cobweb disease. In: *Science and cultivation of edible and medicinal fungi*. Amsterdam: Wageningen University and Research Centre, pp. 82–85.
- Rogerson C.T., Samuels G.J. 1994. Agaricolous species of *Hypomyces*. *Mycologia*, 86(6): 839–866. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026489>
- Seth P.K., Dar G.M. 1989. Studies on *Cladobotryum dendroides* (Bull: Merat) W.Gams & Hoozem, causing cobweb disease of *Agaricus bisporus* and its control. *Mushroom Science*, 12: 711–723.
- Tamm H., Pöldmaa K. 2013. Diversity, host associations, and phylogeography of temperate aurofusarin-producing *Hypomyces/Cladobotryum* including causal agents of cobweb disease of cultivated mushrooms. *Fungal Biology*, 117(5): 348–367. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.005>
- Vedder P.J.C. *Modern Mushroom Growing*. Culemborg: Educaboek, 1978, 420 pp.

Рекомендує до друку
М.М. СУХОМЛИН

Надійшла 18.02.2019