

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. – МР. 216 «С». 2023.02.15. 7 ПЗ

НУБІП України

ПАНА ІОРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології  
УДК 606:631.333:582.28

ПОГОДЖЕНО  
Декан факультету  
захисту рослин, біотехнологій та екології  
Колемісць Ю.В.  
2023 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувача кафедри  
екобіотехнологій та біорізноманіття  
Кваско О.Ю.  
«    » 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
на тему «Отримання ендомікоризи у гідропонних установках»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»  
(назва)  
Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми  
д. с.-г. наук, професор  
(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.  
(підпис) (ПІБ)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи  
д. с.-г. наук, професор  
(науковий ступінь та вчене звання)

Патика М.В.  
(підпис) (ПІБ)

Виконав  
(підпис)

Панца Ю.А.  
(ПІБ студента)

КИЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

# НУБІП України

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

“ ” 2023 р.

# НУБІП України

## ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Паші Юрія Анатолійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Отримання ендомікоризи у гідропонних установках»

Затверджена наказом ректора НУБІП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: рослини, симбіотичні мікоризні гриби, гідропонні установки

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Визначення біомаси кореневої системи рослин різних видів для отримання мікоризи
2. Визначення оптимального режиму живлення рослин для отримання мікоризи
3. Визначення впливу типу гідропонної установки на продуктивність нарощування біомаси коренів

Перелік графічного матеріалу: 12 ілюстрацій

Дата видачі завдання 4 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

# НУБІП України

	ЗМІСТ	
ВСТУП		3
РОЗДІЛ 1		7
1.1. Мікориза		7
1.1.1. Історія досліджень		7
1.1.2. Арбускулярна мікориза		8
1.3. Гідропоніка		16
1.3.1. Історія досліджень і застосування		16
1.3.2. Типи гідропонних установок		18
РОЗДІЛ 2		21
2.1. Підготовка експериментальної частини		21
2.1.1. Планування експериментальних досліджень		21
2.1.2. Матеріали та обладнання		22
2.1.3. Попередні та модельні дослідження		24
2.1.1. Відбір культури-мікотрофа		24
2.1.3. Вибір частоти наповнення установок		31
2.2. Отримання та виділення мікоризи		34
РОЗДІЛ 3		40
3.1. Аналіз експериментальних даних		40
3.1.1. Відбір культури-мікотрофа		40
3.1.2. Вибір типу гідропонної установки		45
3.1.3. Вибір частоти наповнення установок		49
3.1.4. Отримання та виділення мікоризи		53
ВИСНОВКИ		59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		64

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВСТУП

В даній роботі вивчається отримання в гідропонних установках мікоризи між видами *Rhizophagus irregularis* (стара назва — *Glomus intraradices*) та

Мікориза (грибокорінь) є симбіозом, що утворюється гіфами гриба та корінням рослин. В процесі такого співіснування рослина постачає органічні речовини гіфам гриба, а грибний міцелій переносить воду і розчинені в ній поживні речовини з ґрунту до коріння рослини.

До утворення мікоризи здатна більша частина усіх видів рослин, адже це співіснування зазвичай є взаємовигідним для обох сторін.

Високу ефективність мікоризного симбіозу демонструють ендомікоризні гриби, а саме — гриби, що здатні утворювати арбускулярну ендомікоризу.

Арбускули являють собою видозмінені, сильно розгалужені гіфи, що проникають безпосередньо в клітини кореня і завдяки великій площі контакту забезпечують ефективний обмін речовин між міцелієм гриба-симбіонта і клітинами рослини-хазяїна.

Утворення арбускулярної мікоризи є характерною рисою усіх представників відділу *Glomeromycota*, до якого відноситься *R. irregularis*.

Іншою важливою особливістю усіх *Glomeromycota* є облігатно-симбіотрофний спосіб живлення, тобто для нормального існування гриб має отримувати від рослини-господаря усі необхідні поживні речовини. Це значно ускладнює культивування та вивчення даних грибів в лабораторних умовах, а

також їх масову культивування. Попри це, завдяки здатності підвищувати стійкість рослини до несприятливих умов навколишнього середовища (шляхом покращення їх мінерального живлення та водного режиму), дані гриби мають великі

перспективи до широкого впровадження у сільське господарство.

Гідропоніка, що за останні роки набирає все більшу популярність для культивування різних культур, являє собою метод вирощування рослин, при якому рослини отримують воду і поживні речовини не з ґрунту, а з рідкого поживного розчину. Цей розчин містить усі необхідні для рослини елементи

а для додаткового підвищення ефективності вирощування штучно насичується киснем з повітря. Вирощування рослин на гідропонних установах може бути у декілька разів більш ефективним, ніж стандартне вирощування у ґрунті.

Об'єктами дослідження стали рослини, що вирощувалися у гідропонних установах, в першу чергу - Салат посівний листовий (*Lactuca sativa* var. *secalina*) сорту "Австралійський", а також гриб *R. irregularis*.

Предметом дослідження стало утворення мікоризи між рослинами, що вирощувалися у гідропонних установах, та *R. irregularis*.

Мета роботи: розробити метод отримання мікоризи *R. irregularis* на коренях рослин у гідропонних установах, який можна було б використовувати для отримання біопрепарату з даного гриба.

Для досягнення поставленої мети було визначення наступні завдання:

1. Визначити види і сорти рослин, що мають високі показники утворення кореневої біомаси для отримання достатньої кількості мікоризи під час вирощування у гідропонних установах.
2. Визначити оптимальний для нарощування кореневої біомаси тип конструкції гідропонних установок;
3. Визначити оптимальний режим експлуатації гідропонних установок для нарощування кореневої біомаси;
4. Інокулювати рослини грибом *R. irregularis* шляхом поверхневої обробки насіння і дослідити утворення мікоризи на кореневій системі інокульованих рослин.
5. Визначити ефективність утворення спор *R. irregularis* під час культивації у гідропонних установах.
6. Перевірити можливість використання отриманих спор для інокуляції інших рослин.

Актуальність роботи: мікоризні гриби, вступаючи у симбіоз з корінням рослини-господаря, здатні позитивно впливати на процеси її росту і розвитку шляхом транспортування води і розчинених в ній мінеральних речовин до кореневої системи. Завдяки використанню цієї взаємодії у сільському

господарстві, можливо оптимізувати режими живлення культурних рослин, збільшити ефективність засвоєння поживних речовин та води з ґрунту. Використання рослин, що вирощуються у гідропонних системах, для отримання спор мікоризних грибів, є перспективним методом виробництва грибних інокулянтів завдяки ефективності та простоті.

Практична частина роботи була виконана на базі Національного Університету Біоресурсів і Природокористування України, на кафедрі екобіотехнологій та біорізноманіття.

У ході виконання роботи були використані стандартні біотехнологічні методики та методи лабораторного дослідження, зокрема – гідропонне культивування рослин за контрольованих умов, мікроскопічне дослідження забарвлених та незабарвлених зразків, вимірювання ростових параметрів рослин, поверхнева інокуляція насіння, тощо.

Новація підходу: в описаних до цього часу способах отримання мікоризного гриба *R. irregularis* у гідропонних установках на коренях *L. sativa* здебільшого використовували зміну режимів фосфорного живлення для оптимізації продукування міцелію та пропагул. Вплив режимів водного живлення на ефективність продукування спор даного гриба був описаний для гідропонних установок типу NFT (Nutrien Film Technique, система поживного шару), а не DWC (Deep Water Culture, метод глибоководних культур). Крім того, на установках даного типу вперше була досягнута максимальна ефективність інокуляції рослин пропагулами гриба при загальному спрощенні методів культивування.

Отримані результати дослідження мають велике практичне значення і потенціал для широкого впровадження у біотехнологічне виробництво на базі гідропонних ферм. Наведена у роботі послідовність дій може бути використаною як для подальшої оптимізації методів отримання мікоризи на коренях *L. sativa* у гідропонних установках, так і для аналізу інших культур-мікогребів на предмет взаємодії з грибами-симбіонтами.

Робота складатися з вступу (обсягом 4 сторінки), основної частини (обсягом 51 сторінка), висновків (5 сторінок), списку літературних джерел (53 штук) і додатків (1 штука).

Автори роботи виражають вдячність Обезному Олександрові Івановичу,

кандидату біологічних наук, за консультативну допомогу.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

# НУБІП УКРАЇНИ

## 1.1. Мікориза

### 1.1.1. Історія досліджень

Загалом історія дослідження явища мікотрофності почалася близько полутора століть тому. В той час були отримані перші наукові описання взаємодії коренів вищих рослин із гіфами гриба, показана важливість і широка поширеність такої взаємодії [6]. Були висунуті гіпотези про необхідність такого симбіозу для нормального поглинання рослинами поживних речовин з гумусу ґрунту. Крім того, у XIX столітті був введений термін “мікориза” (“грибокорінь”) і створена перша описова класифікація її різновидів [7].

Хоча одразу після відкриття мікоризи почали проводитися активні дослідження її анатомічних і фізіологічних особливостей, вперше особливості будови саме арбускулярної мікоризи були описані А. Шліхтом лише у 1889 році

Вагомий вклад у дослідження анатомії і фізіології мікоризи вніс Е. Шталь, яким було описано понад 3000 видів рослин. У 1900 році в своїй роботі він зробив перше науково обґрунтоване припущення стосовно механізму мікотрофного живлення рослин. Під час досліджень численних видів рослин він помітив, що у рослин, які здатні активно утворювати мікоризу, кореневі волоски редуковані, а транспіраційний потік слабкий. Трохи згодом позитивна роль мікоризи в житті рослин була доведена, були проведені перші спроби виділення грибів, що утворюють мікоризу, у чисту культуру [9].

В 20-ті роки XX століття відбувалися численні спроби синтезу мікориз в умовах *in vitro*, велася розробка методик застосування мікоризних грибів в сільському господарстві, лісорозведенні. Завдяки постійному удосконаленню методів дослідження, на протязі XX проводилися активні роботи по дослідженню особливостей анатомії і фізіології мікоризи різних типів, були створені класифікатори-визначники типів мікоризи і навіть окремих видів мікоризних грибів [10].

З кінця XX століття, після появи молекулярних методів дослідження, з'явилися можливості точно ідентифікувати види мікоризних грибів, досліджувати особливості симбіотичної взаємодії рослини і гриба як на молекулярному рівні, так і на рівні цілих екосистем. Було показано, що симбіоз рослини і гриба може мати не тільки мутуалістичний, взаємовигідний для обох учасників характер, а бути нейтральним для одного з них чи навіть шкідливим

### 1.1.2. Арбускулярна мікориза

Арбускулярна мікориза (або везикулярно-арбускулярна мікориза, АМ, ВАМ)

є тип ендомікоризи, що характеризується наявністю арбускул — густо розгалужених сіток гіф, що забезпечують обмін речовин між рослиною і грибом завдяки великій площі контакту [12].

Утворення арбускулярної ендомікоризи характерне для грибів відділу близько 80% усіх судинних рослин, окрім представників родин лободові

Арбускулярну мікоризу здебільшого можна виявити тільки шляхом мікроскопічного дослідження коренів рослин, на відміну від ектормікоризи.

Єдиною зовнішньою ознакою утворення арбускулярної мікоризи є забарвлення коренів, що утворюють мікоризу, у жовтий колір, яке спостерігається у деяких видів рослин-мікотрофів [14].

Важливою особливістю усіх представників порядку *Glomeromycota*, є облигатний симбіотрофний спосіб живлення. Це унеможливає культивування грибів цього порядку на поживному середовищі і значно ускладнює процес вивчення цих грибів [15].

Хоча впродовж останніх трьох десятиліть у наукових публікаціях була показана теоретична можливість культивування представників цього порядку на поживному середовищі без наявності коренів рослин, такі гриби не продукують нормальної кількості життєздатних спор [16].

Після гермінації спор у ґрунті, гіфи гриба проростають крізь його товщу у сторону кореня рослини, розпізнаючи напрямок за зміною концентрації розчинних ексудатів, що продукуються кореневою системою рослини-мікотрофа.

Після розпізнавання поверхні кореня гіфи гриба формують аппресорії на його поверхні, після чого гіфи гриба проникають крізь клітини епідермісу кореня у його паренхіму [17].

В залежності від подальшої поведінки гіф гриба в товщі кореня, виділяють 2 типи арбускулярної ендомікоризи — *Arum*-тип і *Paris*-тип (типи названі за іменем роду, для якого такий тип АМ було описано вперше — Кліщинець, *Arum*, та Вороняче око, *Paris*) [18].

Під час утворення мікоризи типу *Arum*, гіфа утворює кільцеву структуру у клітині епідермісу кореня або у клітині першого шару кортексу, а потім поширюється за міжклітинним простором. Поширюючись у міжклітинному просторі кореня, гіфи проникають у клітини і інтенсивно гілкуються, утворюючи арбускули, які є основними структурами, що забезпечують обмін речовин між грибом та рослиною [19].

При утворенні мікоризи за типом *Paris*, після інфікування першої клітини, гіфа поширюється з клітини до клітини, утворюючи в кожній кільцеподібні структури. Гілкування цих структур і призводить до утворення арбускул у клітинах кореня [20].

В одного виду арбускулярних ендомікоризних грибів може спостерігатися утворення арбускул одразу за обома типами. Крім того, існують перехідні форми між обома типами [18].

Деякі представники порядку Гломероміцетів окрім арбускул здатні утворювати внутрішньокореневі або позакореневі везикули — здуття на гіфах, заповнені ліпідним розчином. Утворення везикул відбувається лише після формування певної кількості арбускул, що свідчить про необхідність одержання великої кількості органічних речовин від рослини-хазяїна для початку їх утворення [21].

Везикули зазвичай утворюються з кінцевих гіф або їх бічних відгалужень. При цьому клітина, що перетворюється на везикулу, збільшується у розмірах, відбуваються зміни у цитоплазмі і клітинній стінці, що можна спостерігати за зміною забарвлення під час мікроскопічних досліджень [22].

Після утворення везикули заповнюються ліпідною речовиною. Було показано, що у деяких везикулах можуть мешкати ендосимбіотичні бактерії [23].

Позакореневий міцелій ендомікоризного гриба являє собою розгалужену сітку гіф, основною функцією якої є всмоктування поживних речовин і води з ґрунту і транспортування їх до клітин кореня рослини-господаря [24].

При постачанні поживних речовин і води рослині-господарю використовується одночасно декілька фізіологічних механізмів, що збільшують ефективність їх всмоктування і транспортування [25].

Першим механізмом, який забезпечує більш ефективний транспорт води і розчинених в ній поживних мінеральних речовин, є капілярний ефект. При цьому гіфи гриба всмоктують воду за механізмом, аналогічному всмоктуванню води кореневими волосками на всмоктувальній зоні кореня. Відмінність полягає у розмірах поперечного перерізу корневих волосків і гіф гриба — у коренів він може бути більший до декількох разів (11-18 мкм у гіф і від 15 до декількох десятків мікрометрів у корневих волосків). Менша товщина гіф мікоризного гриба дозволяє їм всмоктувати воду із розчиненими в ній поживними речовинами з тонких проміжків між частинками ґрунту і транспортувати її до рослини-господаря [26].

Крім того, гіфи гриба здатні проростати у ґрунт на більшу відстань (до 10 сантиметрів), ніж довжина корневих волосків, а загальна довжина гіф мікоризи однієї рослини може сягати багатьох кілометрів (в одному кубічному сантиметрі ґрунту можуть знаходитися сотні метрів гіф мікоризного гриба). Щільність розташування гіф, що виходять з рослини, а також їх велика довжина призводять до збільшення площі контакту коріння із ґрунтом у декілька разів [27].

Другим механізмом, що забезпечує ефективне засвоєння рослиною поживних речовин з ґрунту, є зміна хімічної реакції ґрунтового середовища.

Завдяки продукуванню органічних сполук гіфами гриба у зайнятих ними мікрозонах відбувається зміна рівня рН ґрунту. Це викликає часткову трансформацію нерозчинних форм багатьох мінеральних сполук (в першу чергу, фосфору) у розчинні [28].

Крім того, завдяки здатності продукувати ферменти, мікоризні гриби здатні розкласти складні сполуки до простих мінеральних молекул, що можуть використовуватися для живлення рослини-хазяїна. Так, завдяки продукуванню ферментів класу фосфатаз, симбіотичні мікоризні гриби отримують доступ до складних сполук фосфору (ДНК та білків), що після ферментативного розкладання до простих мінеральних молекул транспортуються до рослини-хазяїна [29].

Схожий позитивний вплив на поглинання важливих для рослини мінеральних речовин був показаний для азоту, міді, калію, магнію та багатьох інших елементів [30].

Симбіотична взаємодія рослини-господаря і мікоризного арбускулярного гриба може призводити до збільшення ефективності завоювання деяких елементів більше ніж у півтора рази [31].

Крім того, симбіотичні ендомікоризні гриби є продуцентами широкого спектру біологічно активних речовин (вітамінів, фітогормонів та антибіотиків), що здатні посилювати стійкість рослин до багатьох біогенних та абіогенних стресових факторів, підвищувати врожайність рослини-господаря [32].

Завдяки описаним властивостям біодобрива-інокулянти на основі симбіотичних мікоризних грибів використовуються у вирощуванні сільськогосподарських культур. Використання даних інокулянтів дозволяє оптимізувати режими мінерального живлення рослин завдяки здатності підвищувати поглинання мінеральних речовин рослинами, підвищувати їх стресостійкість, тощо [33].

Крім того, завдяки описаній здатності продукувати назвні ферменти, мікоризні гриби сприяють розкладанню органічних речовин, в тому числі токсикантів. Дана властивість дозволяє використовувати біопрепарати на основі

мікоризних грибів для очищення забруднених ґрунтів, відновлення деградованих екосистем [34].

Одним з найбільш важливих показників родючості і здоров'я ґрунту є вміст органічного вуглецю. Доказано, що більша частина стабільних форм вуглецю у ґрунті асоційована з GRSP (Glomalin-related soil proteins) — групою білків із загальною назвою гломалін, що продукуються ендомікоризними грибами, основним представником яких є *R. irregularis*. Дані білки були названі за старою назвою роду (*Glomus*) основних продуцентів у ґрунті [35].

Через здатність до фіксації карбону у ґрунті використання мікоризних інокулянтів у поєднанні з сталими методами обробітку ґрунту (no-till, strip-till) може використовуватися для підвищення вмісту стабільних форм карбону на полях, після доведення якого за допомогою методів хімічного аналізу ґрунту у фермерського господарства з'являється можливість отримання карбонових кредитів за вилучення оксиду вуглецю ( $\text{CO}_2$ ) з атмосфери [36].

Водночас методики отримання спор мікоризних грибів є достатньо складними, потребують наявності великої кількості лабораторного обладнання та мають не дуже високу ефективність [9].

Оскільки представники цієї групи є облигатними біотрофами, для отримання міцелію даних грибів у лабораторних умовах необхідно використовувати або культури тканин кореня, або цілі рослини [9].

Крім того, була показана можливість отримувати міцелій даних грибів на коренях рослин у гідропонних установках, що є більш економічно вигідним у порівнянні з іншими методами [37].

) — вид арбускулярних ендомікоризних грибів, що завдяки позитивному впливу на рослини широко використовується у якості інокулянта в сільському господарстві та інших галузях рослинництва (лісорозведенні, біоремедіації, тощо) [38].

є хемоорганогетеротрофом та облигатним біотрофом. Усі органічні речовини він здатний отримувати тільки від рослини-хазяїна, з яким утворює мікоризу. Цей

фактор значно ускладнює культивування даного виду в лабораторних умовах, виділення чистої культури, введення в культуру *in vitro* та інші лабораторні дослідження та маніпуляції [38].

Стара назва виду (*Glomus intraradices*) була змінена на нову у 2001 за результатами молекулярного аналізу послідовності рРНК [39].

Гіфи *R. irregularis* мають круглу чи злегка сплюснену форму поперечного перерізу, шириною 11-18 мкм, довжиною до кількох сантиметрів. Гіфи мають здатність до інтенсивного галуження як у кореневій системі рослини-господаря,

так і у ґрунті. *R. irregularis* здатний до утворення арбускул в клітинах кореня рослини-господаря [40].

Утворення арбускул може спостерігатися як за *Arum*-, так і за *Paris*-типом, тобто під час розповсюдження гіф Гриба у кореневій системі він здатний рухатися як від клітини до клітини, утворюючи в кожній арбускулі, так і у міжклітинному просторі (в цьому випадку арбускулі в середині клітин утворюються з бічних відгалужень гіф) [18].

Спори можуть бути безбарвними, білими, або жовто-коричневими. Зазвичай мають еліптичну або сфероподібну форму, але описано утворення спор іншої форми. Розмір спор — 40-140 мкм [41].

Утворення спор може спостерігатися як в інтракоренових, так і в позакоренових гіфак. При цьому спори можуть утворюватися як щільними групами, так і бути дифузно розповсюдженими по сітці гіф, в залежності від виду рослини-господаря [42].

здатний розповсюджуватися як спорами, так і фрагментами міцелію (гіфами). Фрагменти коріння рослин, раніше колонізовані даним видом, також можуть слугувати резервуаром для даного виду у спроби [43].

Ареал розповсюдження даного виду охоплює всі кліматичні зони. Гриби цього виду можуть бути знайдені майже в усіх типах ґрунтів, включаючи лісові ґрунти, поля під пропашними культурами, пасовища і навіть пустелі [42].

Життєвий цикл *R. irregularis* простий, змін поколінь не відбувається [44]. *R.*

Цей гриб допомагає рослинам підвищити поглинання води і поживних речовин з ґрунту. Існує велика кількість потенційних рослин-господарів, з якими *R.* різних груп, зокрема зернові культури (Пшениця, *Triticum* spp., Ячмінь звичайний, *Hordeum vulgare*, Кукурудза звичайна, *Zea mays*, Овес посівний, *Avena* звичайна, *Phaseolus vulgaris*), Овочеві і пасльонові культури (Томат, *Solanum*

# НУБІП УКРАЇНИ

# НУБІП УКРАЇНИ

Навіть з неповного переліку можливих рослин-господарів видно, що даний вид здатний утворювати мікоризу із великою кількістю різних видів рослин з різних сімейств [46].

# НУБІП УКРАЇНИ

Даний вид є широкоживаною культурою-інокулянтом для різних видів культурних рослин завдяки здатності посилювати стійкість рослин до біогенних та абіогенних стресорів. Транспортуючи поживні речовини та воду за розгалуженою мережею гіф з ґрунту до коріння рослини-господаря, він здатний

# НУБІП УКРАЇНИ

суттєво впливати на продуктивність сільськогосподарських культур [43].

## 1.2.1. Особливості біології та екології *Lactuca*

Латук, або Салат — рід трав'янистих рослин сімейства айстрові (*Asteraceae*), порядку айстроцвіті (*Asterales*), що відноситься до справжніх покритонасінних рослин (евдикотів, *Eudicots*). Наукова назва роду походить від латинського *Lac* (молоко), через здатність виділяти сік білого кольору при пошкодженні стебел та листя рослин [47]. До цього роду відносяться як однорічні, так і дво- і багаторічні трав'янисті рослини [48].

# НУБІП УКРАЇНИ

До роду відноситься велика кількість видів, що мають велике господарське значення, передусім — *L. sativa*. Представники цього виду вживаються в їжу у свіжому вигляді чи після певної обробки [49].

Ареал поширення представників даного роду охоплює весь світ, але основним осередком є Євразія. Значна кількість представників даного роду є ксерофітами — рослинами, пристосованими до росту в посушливих регіонах, в тому числі в екваторіальній Африці [50].

Деякі представники роду є компасними рослинами. Є холодостійкою рослиною, діапазон оптимальних температур — 17-20°C, може переносити нетривалі заморозки [50].

Суцвіття — кошик жовтого або блакитного кольору, характерне для усіх представників *Asteraceae*. Рослини мають пряме стебло від 15 до 120 сантиметрів, листи соковиті, різної форми та розмірів, в залежності від виду, колір — світло- або темно-зелений, але існують сорти із червоним та фіолетовим листям [47].

Зазвичай листки зібрані в розетку або утворюють качан, який у багатьох видів є основним запасуючим органом. Плід — сім'янка довгастої або сплющеної

Рослини можуть бути само- або перехреснозапильними, запилюються комахами або вітром. Коренева система стрижнева, але має велику кількість бічних відгалужень у потовщеній верхній частині [48].

#### 1.2.2 Ботанічний опис *L. sativa*

Салат посівний (*Lactuca sativa*) — однорічна трав'яниста рослина сімейства айстрові (*Asteraceae*), що є поширеною овочевою культурою [50].

Висота листової розетки коливається від 15 до 30 сантиметрів, але на кінцевих етапах вегетації утворюється стебло висотою до 120 сантиметрів [49].

Листя зібрані в розетку, прикореневі листки добре розвинені, витягнуті, овальної, округлої чи стрілкоподібної форми, з рівним чи зубчастим краєм.

головчастого різновиду утворюють качан округлої чи овальної форми. У більшості сортів листя зеленого кольору, але у деяких сортів листя можуть бути червоними або фіолетовими [47].

Коренева система стрижнева, але має велику кількість добре розгалужених додаткових коренів. Суцвіття — кошик, плід — дрібносім'янка білого кольору

### 1.2.3. Досліджувані сорти і різновиди *L. sativa*

Салат головковий (*L. sativa* var. *capitata*) — різновид Салату посівного, листя якого утворює качан (головку) округлої чи овальної форми, який вживається в їжу. Період технічної стиглості — від 50 до 160 днів [48].

Під час виконання практичних лабораторних дослідів у якості одного з об'єктів дослідження був використаний Салат головковий сорту “Айсберг”. Цей

сорт утворює качан масою до 500 грамів, період технічної стиглості — 70-75 днів

"URL": "https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-

6\_5", "author": "Doležalová, Hriegerová, & Kitner", "given": "M.", {"family": "Doležalová", "given": "Hriegerová", "family": "Kitner", "given": "M."}, {"family": "Doležalová", "given": "Hriegerová", "family": "Kitner", "given": "M."}

У якості одного з об'єктів дослідження був використаний салат листовий сорту “Австралійський”. Листя цього сорту не утворює повноцінного качана, але розташовується щільно одне до одного, період технічної стиглості — 60-70 днів

d weedy *Lactuca* species, their distribution, ecogeography and ecobiology in USA and

Canada, volume 159 (author: "Doležalová", "given": "Hriegerová", "family": "Doležalová", "given": "Hriegerová", "family": "Kitner", "given": "M.")

під час виконання практичних лабораторних дослідів у якості одного з об'єктів дослідження був використаний салат листовий сорту “Австралійський”. Листя цього сорту не утворює повноцінного качана, але розташовується щільно одне до одного, період технічної стиглості — 60-70 днів

### 1.3. Гідропоніка

#### 1.3.1. Історія досліджень і застосування

Дослідження росту і розвитку рослин, вирощених у воді за повної відсутності ґрунту чи будь-якого іншого субстрату проводилися ще у XVII столітті. Завдяки використанню давно відомої технології дистиляції (отримання рідини з конденсованого пару) вдалося визначити основні елементи, необхідні

для росту і розвитку рослин. Так, у 1699 році натураліст Джон Вудвард

опублікував наукову працю, де порівнював розвиток рослин у дистильованій і звичайній воді [51].

У XIX столітті німецькими ботаніком Юліусом фон Саксом та агрохіміком Вільгельмом Кнопфом були розроблені методи культивування рослин за відсутності ґрунту. Навіть за використання тогочасних технологій деякі рослини демонстрували кращі показники під час вирощування у розчині поживних речовин, ніж при стандартному вирощуванні на ґрунті [8].

Завдяки можливості точно регулювати пропорції та концентрацію мінеральних речовин у поживному розчині, культивування рослин у поживному розчині замість ґрунту набула широкого використання в агрохімічних дослідженнях, і зберігає свою актуальність до сьогодні [51].

Термін “гідропоніка” був введений у 1937 році Вільямом Геріке, дослідником живлення рослин. Книга його авторства “Complete Guide to Soilless Gardening” (“Повний посібник із безґрунтового садівництва”), що вийшла у 1940 році, містила вичерпну інформацію про конструкцію гідропонних установок, оптимальний хімічний склад поживних розчинів, особливості вирощування основних видів культурних рослин у гідропонних установках і іншу важливу інформацію [36].

Одним з перших успішних випадків впровадження гідропоніки в комерційне виробництво, стала гідропонна ферма на острові Вейк, розташованому в північній частині Тихого океану. На острові, що являв собою кораловий атол без родючого ґрунту, знаходилася проміжна заправна станція літаків авіакомпанії “Pan American World Airways”. Через високу вартість транспортування свіжих овочів повітряним транспортом, на острові була побудована гідропонна ферма, продукція якої входила до складу блюд в меню на борту авіаліній [37].

Завдяки здатності вирощувати рослини з меншими витратами води та поживних речовин, у другій половині XX століття гідропоніка стала об’єктом детального вивчення NASA. Під час численних програм дослідження у сфері розробок CELSS (Controlled ecological life-support system, Керованих екологічних систем життєзабезпечення), що почалися в другій половині XX століття і тривають до сьогодні, вивчалася можливість використання марсіанського ґрунту у якості основного субстрату для гідропонних установок, вирощування

рослин за умов штучного освітлення, створення замкнених екологічних систем для тривалого перебування в космосі [52].

Темпи росту об'єму ринку використання гідропоніки для вирощування рослин кожного року перевищують прогнозовані у декілька разів. Замість спрогнозованих у 2017 році 725 мільйонів доларів США до 2023-го року, загальний обсяг ринку становив 2,1 мільярди USD вже у 2020-му році. За оцінкою Grand View Research, проведеною у 2019 році, тільки сумарний прибуток від використання гідропоніки у 2028 становитиме 9,8 мільярди доларів США [51].

### 1.3.2. Типи гідропонних установок

Існує велика кількість різновидів конструкцій гідропонних систем. Загалом гідропонні установки всіх типів за способом подачі і аерації поживного розчину поділяються на активні та пасивні [48].

В пасивних системах гідропоніки відсутні будь-які рухомі елементи, а подача поживного розчину і аерація протікає без додаткових затрат енергії, лише за рахунок використання капілярних сил та дифузії газів. Подібний метод вирощування рослин підходить лише для культур, що мають уповільнений обмін речовин і повільно ростуть [37].

Активні гідропонні системи вимагають затрат енергії для забезпечення циркуляції поживного розчину та його аерації [51].

Існує велика кількість підтипів гідропонних систем, але основними є:

1. Deep Water Culture (DWC), Система глибоководних культур;
2. Nutrient Film Technique (NFT), Система поживного шару;
3. Система періодичного затоплення;
4. Аеропоніка;

У системах глибоководних культур (DWC) рослини розміщуються в культивацийних ємностях, що мають велику кількість перфорацій на нижній і бокових сторонах. Самі рослини можуть розміщуватися в субстраті, у якості якого може виступати керамзит, базальтова вата, кокосове волокно, піноскло та велика кількість інших речовин. Культивацийні ємності розміщують в установці

таким чином, щоб забезпечити контакт коренів із поживним розчином, яким заповнений основний бак установки [53].

Поживний розчин під час експлуатації установки аерується за допомогою компресора, який через систему розпилювачів прокачує повітря крізь товщу рідини. При цьому відбувається газообмін між повітрям і поживним розчином, який насичується киснем. Цей процес, хоча і потребує затрат енергії для роботи компресора, значно збільшує ефективність вирощування рослин за рахунок того, що коріння, знаходячись в насиченому мінеральними речовинами і киснем поживному розчині, активно поглинає необхідні речовини і транспортує їх до надземної частини рослини [53].

Основною перевагою гідропонних систем, побудованих за принципом DWC, є висока надійність та низька собівартість конструкції через відсутність додаткових насосів для циркуляції рідини. Крім того, відсутність насосів зменшує операційні затрати на експлуатацію установки [53].

У гідропонних системах типу NFT коріння рослин також розташовується у поживному розчині, але за даного типу, на відміну від DWC, рідина не постійно знаходиться у камері з корінням рослин, а циркулює за замкненим контуром. При цьому поживний розчин протікає тонким шаром по жолобу, в якому знаходиться коріння рослин, забезпечуючи велику площу газообміну між рідиною і повітрям. Крім того, можлива додаткова аерація поживного розчину у баку, куди збирається рідина для рециркуляції [51].

За використання гідропонних систем даного типу вирощується більша частина швидкоростучих культур — салатів та зелені. Але при цьому даний метод не позбавлений недоліків повністю [37].

По-перше, установки даного типу мають нижчу надійність у порівнянні із типом DWC через наявність більшої кількості рухомих компонентів, в першу чергу — насосу, що забезпечує перекачування рідини, а також системи труб для збору і рециркуляції води [53].

По-друге, дані установки мають суттєві обмеження на максимальну довжину жолобу для стоку води через поступове потливання рослинами

поживних речовин з розчину (рослини, що знаходяться ближче до вводу поживного розчину, зазвичай ростуть краще, ніж ті, що знаходяться біля протилежного боку) [37].

Крім того, для коректної роботи установок типу NFT необхідно забезпечити протікання поживного розчину тонким шаром на протязі усієї довжини жолоба, а це вимагає точного регулювання куту нахилу установки під час монтажу [51].

До інших типів гідропонних установок відносяться системи періодичного затоплення (конструкція яких передбачає періодичне затоплення субстрату поживним розчином за допомогою насосу або механічне занурення платформи з

рослинами у контейнер з рідиною) та аеропонні системи (в яких постачання рослині розчину поживних речовин досягається його механічним чи ультразвуковим розпиленням) [53].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

# НУБІП УКРАЇНИ

## 2.1. Підготовка експериментальної частини

### 2.1.1. Планування експериментальних досліджень

Експериментальне виконання практичної частини роботи включало в себе початкові (модельні) дослідження, які дозволили оптимізувати процес вирощування рослин-мікотрофів із необхідними параметрами, та власне отримання мікоризи в гідропонних установках.

Такий порядок виконання експериментальних досліджень був обраний через необхідність максимізації кількості кінцевого продукту в біотехнологічному процесі отримання мікоризних грибків.

Оскільки *R. irregularis* є obligatним біотрофом, він здатний рости тільки у симбіозі із кореневою системою рослини-хазяїна. Тому для збільшення виходу кінцевого продукту (пропагул *R. irregularis*, в першу чергу — спор) необхідно максимізувати масу кореневої системи рослини-хазяїна [40]. Для цього в першу чергу необхідно було підібрати культуру, що придатна до вирощування у гідропонних установках, має відносно велику масу і ступінь галузнення кореневої системи, а також оптимальну із точки зору потокового виробництва кінцевих продуктів довжину вегетаційного періоду.

Значною мірою ефективність вирощування рослин у гідропонних установках залежить від їх типу. Наприклад, культури, що мають повільну швидкість росту, можна вирощувати на установках NFT. Конструкція таких установок не передбачає використання великої кількості аераційних систем, що дозволяє знизити як собівартість установки, так і витрати електроенергії на аерацію поживного розчину. З іншого боку, рослини, що ростуть швидко, потребують активної аерації поживного розчину для нормального розвитку [53]. Тому під час попередніх експериментальних досліджень необхідно було визначити оптимальну конструкцію гідропонної установки.

Окрім того, відомо, що періодична тимчасова експозиція кореневої системи на повітрі (вилучення із живильного розчину) має позитивний стимулюючий вплив на ріст і розвиток кореневої системи у гідропонних установках. З іншого

боку очевидно, що пересихання кореневої системи може негативно вплинути як на поточний стан рослини, так і її подальши ріст і розвиток. Тому необхідним кроком для збільшення маси кореневої системи та кількості виходу кінцевого біотехнологічного продукту є експериментальний підбір оптимальної періодичності додавання живильного розчину до гідропонних установок.

#### 2.1.2. Матеріали та обладнання

Для культивування рослин використовували гідропонні установки двох типів – NFT та DWC власного виробництва. Об'єм установок - 11,8 та 4 літрів відповідно.

Для освітлення рослин, що вирощувалися у гідропонних установках, використовували лампи двох типів:

1. Бездрайверні фітолампи на основі LED-модулів SMD 2835 потужністю 50 Вт, із світловим потоком 3800 люмен.

2. LightMaster LC-76 LED, потужністю 54 Вт. Колірна температура світла ламп - 6500 К, світловий потік – 4400 люмен.

Для аерації поживного розчину в гідропонних установках використовували 2 гнучких акваріумних аератори довжиною 60 см, з'єднаних паралельно, і компресор Resun ACO-004.

Сушку відриваного коріння проводили у сухоповітряному термостаті TC-20 (виробництво ТОВ "МікроМед", країна виробництва - Україна) із об'ємом культиватійної камери 20 літрів за різних температурних режимів.

Для вимірювання температури і вологості повітря під час культивування рослин використовували як готові пристрої (цифровий термогігрометр Wild Wind WHT-201 BL), так і засоби власного виробництва (DIP-модулі DHT11 V2, підключені до мікроконтролеру ESP-8266 у форм-факторі NodeMCU v2).

Для вимірювання кислотності поживного розчину у гідропонних установках використовували рН-метр Milwaukee pH 55 (виробництво – Європейський Союз).

Для вимірювання вмісту загальної кількості розчинених іонів у поживному розчині використовували TDS-метр Milwaukee CD 611 (виробництво – СС).

У якості основного об'єкту дослідження були використані насінини, проростки та дорослі рослини Салату посівного листового (*Lactuca sativa* var. *capitata*), у якості об'єктів дослідження були використані насінини, проростки і дорослі рослини Салату ендівію кучерявого (*C. endivia*) сорту “Фрізе зелений”, Салату посівного головкового (*L. sativa* var. *capitata*) сорту “Айсберг”, Салату посівного ромен (*L. sativa* var. *romana*), Коріандру посівного (кінзи, *C. sativum*) сорту “Янтар”, Меліси лікарської (*M. officinalis*) сорту “Соборна”, М'яти перцевої (*M. piperita*) сорту “Пікантна”, Щавелю шпинатний (*R. patientia*) сорту “Широколистий”, Кропу запашного (*A. graveolens*) сорту “Амброзія”, Шпинату новозеландського (*T. tetragonoides*) сорту “Тетрагонія”.

У якості готового мікоризного інокулянту на основі *R. irregularis* (G. виробництва — США, концентрація пропагул *R. irregularis* (G. *intranadices*) 132 шт/г.

У якості джерела поживних елементів використовували рідкі добрива Flora Growing Grow та Flora Growing Micro, що містять мінеральні компоненти у розчинній формі. Концентрація діючих речовин у Flora Growing Grow: Азот (N) — 3%, Фосфор ( $P_2O_5$ ) — 1%, Калій ( $K_2O$ ) — 6%, Магній ( $MgO$ ) — 0.8%. Концентрація елементів у Flora Growing Micro: Азот (N) — 5%, Калій ( $K_2O$ ) — 1.3%, Кальцій ( $CaO$ ) — 5.0, Залізо (Fe) — 0.12%, Марганець (Mn) — 0.05%, Цинк — 0.004%, Нікель (Ni) — 0.0005%, Кобальт (Co) — 0.0005%. Під час перших 20 днів вегетації для наповнення гідропонних установок використовували розчин добрив із концентрацією 0.1 мл/л і 0.2 мл/л для препаратів Grow та Micro відповідно. Впродовж наступних 20 днів вегетації ці препарати використовували у концентрації по 0.3 мл/л. На протязі останніх 20 днів використовували препарати із концентрацією 1.0 мл/л і 0.5 мл/л відповідно.

Зважування коренів у свіжому і висушеному стані проводилося за допомогою електронних цифрових ваг МН-03В, максимальна можлива вага для вимірювання яких становить 50 г, точність зважування - до 10 мг із похибкою 1 мг.

## 2.1. Попередні та модельні дослідження

Як зазначалося у пункті 2.1.1. (Планування експериментальних дослідів), першим етапом досліджень став вибір культури, властивості якої відповідають визначеним критеріям (велика маса кореневої системи, зручність культивування, достатня довжина вегетативного циклу). Після цього відбувся

експериментальне визначення оптимального типу конструкції гідропонної установки та встановлення оптимального режиму водного живлення для стимуляції розвитку кореневої системи досліджуваних рослин.

### 2.1.1. Відбір культури-мікотрофа

Як зазначалося вище, перед виконанням усіх інших досліджень необхідно було здійснити експериментальний підбір культури, що відповідає б усім визначеним вимогам. Для цього попередньо було складено спінек деяких поширених зелених і деяких лікарських культур, що здатні до вирощування у гідропонних установках і повсюдно вживаються в їжу або використовуються у

якості приправ. До цього списку увійшли:

1. Салат ендивій кучерявий (*Cichorium endivia*) сорту “Фрізе зелений”;
2. Салат посівний листовий (*Lactuca sativa* var. *secalina*) сорту “Австралійський”;
3. Салат посівний головковий (*Lactuca sativa* var. *capitata*) сорту “Айсберг”;
4. Салат посівний ромен (*Lactuca sativa* var. *romana*);
5. Коріандр посівний (кінза, *Coriandrum sativum*) сорту “Янтар”;
6. Меліса лікарська (*Melissa officinalis*) сорту “Соборна”;
7. М’ята перцева (*Mentha piperita*);
8. Любисток лікарський (*Levisticum officinale*);
9. Салат японський (мізуна, *Brassica rapa* ssp. *nipposinica*) сорту “Зелений”;
10. Базилік (*Ocimum basilicum*) сорту “Зелений”;

11. Рукода (*Eruca vesicaria*) сорту “Тікантна”;

12. Щавель щипинатний (*Rumex patifolia*) сорту “Широколистий”;

13. Кріп запашний (*Anethum graveolens*) сорту “Амброзія”;

14. Шпинат новозеландський (*Tetragonia tetragonoides*) сорту “Тетрагонія”;

Усі перелічені культури мають розгалужену кореневу систему і відносно короткі терміни вегетації, що дозволяє вирощувати їх в гідропонних установках.

Крім того, для усіх культур, що приймали участь в експерименті, була показана можливість утворення мікоризи із симбіотичними грибами-мутуалістами роду *Glomus* (*Rhizophagus*), тобто усі культури є мікотрофами [30].

У якості універсального субстрату для культивування усіх обраних видів рослин було обрано дисперсну кокосову стружку. Кокосовий субстрат було обрано через широкий спектр переваг: високу вологоємність за рахунок капілярного ефекту, екологічну безпеку, близький до нейтрального рівень рН, простота використання та ін.

У якості ємностей для культивування було використано контейнери з полістиролу через широкую доступність та хімічну стійкість (у виробках з полістиролу дозволяється тривале зберігання продуктів харчування). Для покращення циркуляції води у культиваційних камерах в них робилися додаткові отвори. Габарити ємностей: 177x84 мм, висота 38 мм, об’єм близько 200 мл. Для зменшення випаровування води з субстрату перед проростанням контейнери щільно закривалися кришками.

Для культивації на етапі попередніх досліджень була використана гідропонна установка типу DWC. Використання саме такої системи було обумовлене продуктивністю аерації живильного розчину. Оскільки молоді рослини, що активно вегетують, мають отримувати достатню ступінь аерації поживного розчину, не можна допустити, щоб вона стала лімітуючим фактором під час попередніх експериментів.

У якості основної ємності для поживного розчину було обрано пластикові контейнерами із габаритами 600x400, висотою 80 мм, матеріал – поліпропілен. Поліпропіленові контейнери також дозволяється використовувати для зберігання

харчових продуктів, а обрані габарити дозволяли розмістити 12 культивацийних ємностей кожний.

Через необхідність попередження розвитку ціанобактерій у поживному розчині для утримання культивацийних ємностей використовувалися не стандартні кришки для контейнерів, рекомендовані виробником, а листи спіненого (екструдованого) пінополістиролу. Лист екструдованого полістиролу товщиною 20 мм затримував світло світлодіодних фітоламп із сумарною потужністю більше 150 Вт, а стандартна поліпропіленова кришка для контейнеру пропускала світло лампи потужністю 14 Вт.

Під час культивування дослідних культур ми використовували три світлодіодні бездрайверні фітолампи на основі LED - модулів SMD-2835 потужністю 50 Вт кожна. Ці лампи були розміщені над рослинами через рівні проміжки, забезпечуючи рівномірний розподіл світла у системі.

Для контролю температури у камерах для вирощування рослин (гроубоксах) використовували датчики вологості і температури (термогігрометри) DHT11 (V2) у кількості трьох штук. Для збереження результатів вимірювання температури і передачі їх у цифровому форматі використовувався мікроконтролер ESP-8266 (у форм-факторі NodeMCU v2).

Датчики температури і вологості повітря (термогігрометри) були встановлені на рівні рослин у затінених щільною матерією місцях для попередження нагріву світлом ламп. Датчики були розподілені всередині установки на рівній відстані один від одного.

Вимірювання проводилося за записаним у пам'ять мікроконтролера алгоритмом одночасно на трьох пристроях кожні три години (загалом 8 вимірювань за добу — о 00:00, 03:00, 06:00, 09:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00).

Постійна температура у приміщенні підтримувалася за допомогою двох побутових кондиціонерів, налаштованих на 17°C.

Використання цифрових пристроїв моніторингу параметрів росту рослин дозволило не тільки отримувати дані про стан рослин в форматі он-лайн, а й зберігати для подальшого аналізу повний архів показників. Температура і

вологість повітря в культивацийній камері вираховувалися як середнє із результатів вимірювання усіх трьох термогігрометрів. Завдяки використанню засобів дистанційного моніторингу параметрів культивації вдалося знизити частоту безпосередніх моніторингів стану рослин.

Для експериментального визначення оптимальної культури-мікотрофа спочатку насіння досліджуваних рослин висаджувалося до культивацийних ємностей в товщу кокосового субстрату. Перед посадкою субстрат був попередньо зволожений демінералізованою водою згідно із рекомендаціями виробника (сухий кокосовий субстрат до води у співвідношенні 1:4). Після

зволоження відбувалася перевірка загальної кількості розчинених іонів за допомогою TDS-meter Milwaukee CD 611 та визначення рівня рН за допомогою рН-метр Milwaukee рН 55. Показники кількості розчинних сполук і рівня рН визначалася не напряму для субстрату, а за результатами промивки бідистильованою водою.

Для визначення залежності ступеня розвитку кореневої системи від щільності посадки насіння висаджувалося до культивацийних ємностей у двох варіантах — 12 і 21 насінина на ємність. Усі досліджувані види рослин висаджували до ємностей за однаковою схемою.

Схема висадки насінин до культивацийних ємностей представлена на рисунку 2.1.

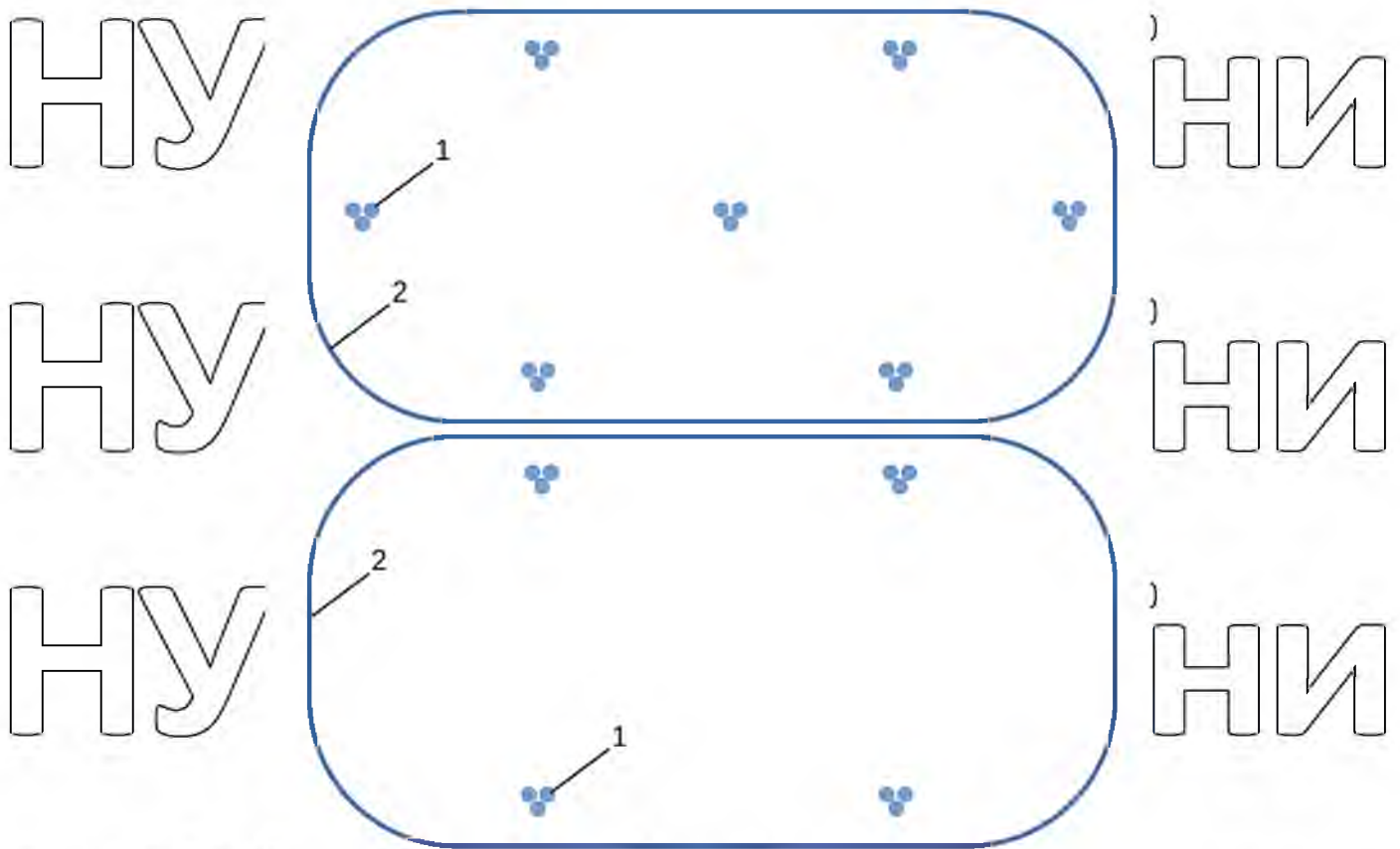


Рис. 2.1. Схема висадки насінин до культивацийних ємностей (1 - окрема насінина, що висаджувалися групою по 3 шт.; 2 - культивацийна ємність)

Висаджування насінин не поодиноким, а групами по 3 дозволяє підвищити продуктивність процесу і широко використовується в практиці гідропонного вирощування.

Після висадки рослин до культивацийних ємностей для попередження передчасного висихання субстрату вони щільно закривалися кришками і переміщалися до готового культивацийного контейнеру гідропонної установки.

Підготовка контейнера включала його поверхневу стерилізацію, а також приготування і заповнення його поживним розчином. Поверхнева стерилізація для попередження розвитку захворювань включала в себе 3 послідовних етапи: промивку водопровідною водою, промивку дистильованою водою та поверхневу стерилізацію 35% розчином перекису водню. За тією самою послідовністю проводили поверхневу стерилізацію аераційної системи – аератора і повітропровідних трубок.

Пригетування поживного розчину проводилося шляхом змішування у стерильній ємності дистильованої води із розчином макро- та мікроелементів у

формі рідких, добре розчинних добрив. Змішування проводилося із дотриманням пропорцій, рекомендованих виробником. Після приготування розчину

проводилося вимірювання кількості розчинених іонів за допомогою TDS-метра Milwaukee CD 611 та рівня рН за допомогою рН-метра Milwaukee рН 55. Для

досягнення оптимальних показників, концентрація поживних елементів у розчині доводилася до рівня 700 ppm шляхом додавання розчину добрив, а рівня рН — шляхом додавання ортофосфорної кислоти до показника 6.5 у розчині.

Після приготування поживний розчин заливався до гідропонної установки і проводилася перевірка роботи аераційної системи. У якості аераційної системи

використовували 2 тнучких акваріумних аератори довжиною 60 см, з'єднаних паралельно, і компресор Resun ACO-004.

Після описаної підготовки гідропонної установки і висадження до неї насіння досліджуваних рослин, для оцінки швидкості проростання насіння і параметрів росту молодих рослин проводили щоденні моніторинги впродовж двох місяців.

Після вегетаційного періоду довжиною два місяці (60 днів, що відраховувалися від дати висадки насіння до гідропонних установок) проводили візуальну оцінку ступеня розвитку і розмірів надземної частини рослин та її

кореневої системи. Після чого вимірювали біомасу кореневої системи рослин у свіжому вигляді.

### 2.1.2. Вибір типу гідропонної установки

Для вибору конструкції гідропонної установки використовували установки двох типів — DWC та NFT.

Для порівняння обох систем гідропоники, Deep Water Culture (DWC) та Nutrient Film Technique (NFT), під час попереднього етапу досліджень (практична реалізація описана в п. 2.1.1., в п. 3.1.1. наведений аналіз результатів) був обраний салат листовий (*L. sativa*) сорту “Австралійський”.

Ми налаштували дві ідентичні за кількістю рослин гідропонні системи двох різних типів — DWC і NFT. Концентрація мінеральних речовин у розчині, необхідних для росту і розвитку рослин, на протязі обох досліджень була

однаковою. Крім того, вирощування проводилося в однаковому субстраті, а самі насіння висаджувалися до стандартизованих мультиблоків з базальтових волокон. Дослідження проводилися паралельно, гідропонні установки були встановлені поруч одна із одною, що значно спростило регулярні моніторинги стану рослин.

Система NFT включала резервуар для розчину, жолоб для стоку води, культивацийні ємності, насос для циркуляції розчину і аераційну систему з компресору і аератора-розпилювача, з'єднаних силіконовим шлангом.

Система DWC має простішу конструкцію, оскільки рослини знаходяться безпосередньо в розчині, який постійно насичується киснем [53].

Підготовка гідропонних установок проводилася аналогічно за попереднім етапом дослідження (монтаж установки, промивка із поверхневою стерилізацією, приготування поживного розчину). Після підготовки установок, приготування розчину та висадки насіння салату, ми регулярно спостерігали за ростом і станом рослин в обох системах, записуючи отримані результати для подальшого аналізу.

Наші спостереження включали в себе оцінку росту салату кожні 4 дні, що включала в себе візуальний моніторинг та вимірювання середньої довжини листових поверхонь. Крім того, під час періодичного обслуговування систем, проводилися вимірювання рівня рН та електропровідності розчину в обох системах, щоб переконатися, що умови для рослин були стабільними.

Для чистоти експерименту і збільшення репрезентативності отриманих результатів для освітлення обох груп досліджуваних рослин використовувалися дві однакові лампи - LightMaster LC-76 LED, потужністю 54 Вт. Колірна температура світла ламп - 6500 К, світловий потік - 4400 люмен.

Після періоду культивації довжиною 45 днів, рослини вилучалися з установок і поверхнево оглядалися на наявність симптомів захворювань кореневої системи і листового апарату. Крім того, після вилучення візуально оцінювали розміри кореневої системи, а потім вимірювали масу відрізнаних

коренів (як у свіжому стані, так і після висушування у термостаті при 50°C на протязі трьох діб) (Рис. 2.2.).



Рис. 2.2. Процес висушування коріння у термостаті

### 2.1.3. Вибір частоти наповнення установок

Під час попереднього етапу досліджень було встановлено, що для утворення великої і розгалуженої кореневої системи найкраще використовувати гідропонні установки типу DWC (Практичне виконання описане в п. 2.1.2., аналіз отриманих результатів описаний в п. 3.1.2.). Але окрім вибору конструкції гідропонної установки необхідним етапом для подальшого ефективного вирощування цільового продукту є вибір оптимальних параметрів експлуатації.

Відомо, що періодичне вилучення коріння рослин з поживного розчину може стимулювати розвиток кореневої системи. З іншого боку, тривалість фази,

коли коріння знаходиться не у розчині, не має бути надмірною, щоб не викликати пригнічення ростових процесів через дефіцит води.

Оскільки під час вирощування відбувається активне випаровування води як з листової поверхні рослин, так і зі зволоженої поверхні субстрату, додаткового вилучення поживного розчину з гідропонних установок не проводили. Ступінь знаходження коріння у товщі поживного розчину натомість регулювалася частотою додавання розчину до установки.

Вплив режиму водного живлення на частоту і швидкість утворення коренів досліджували на 15-ти зразках (5 установок по три повторності) наступним чином: першу установку заповнювали поживним розчином тільки після часткового висихання, другу — після зниження об'єму рідини до 25%, третю — після зниження об'єму до 50%, четверту — до 75%, а об'єм поживного розчину у п'ятій установці постійно підтримували на максимальному рівні.

Кожна установка містила по 8 рослин.

За максимальний, 100%-й, об'єм поживного розчину приймали не стан повного заповнення гідропонної установки, а рівень рідини, що відновідає 65% від загального об'єму установки, оскільки доведено, що повне занурення кореневої системи в розчин негативно впливає на ростові процеси коріння.

Об'єм води в залежності від ступеня наповнення установки вимірювали за формулою 2.1.

де  $V$  — об'єм води у установці,  $V = L \cdot \pi r^2 \cos \alpha - hr$ , (2.1)

$L$  — довжина установки (1,5 метри, 1500 мм);

$r$  — радіус установки (5 сантиметрів, 50 мм);

$h$  — висота води у установці, виміряна лінійкою

Вимірювання рівня води проводили шляхом занурення мірної лінійки з індикатором кута нахилу в установку строго перпендикулярно до площини установки.

Схематичне зображення процесу вимірювання рівня і обчислення об'єму поживного розчину в установках показано на рис. 2.3.

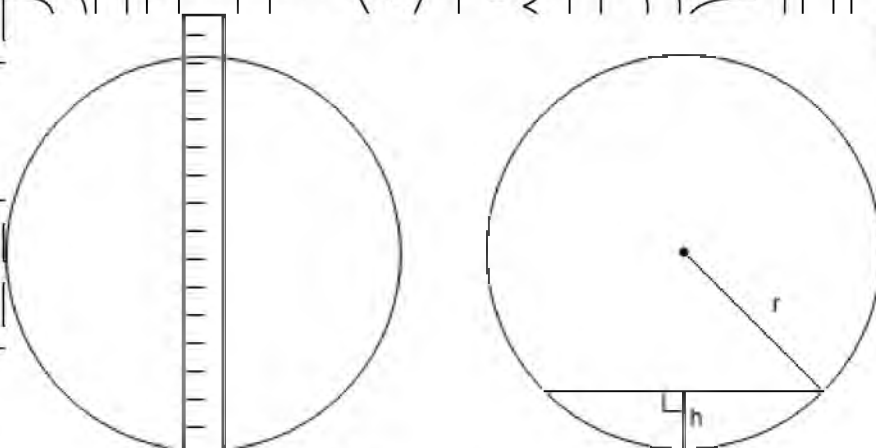


Рис. 2.3. Схематичне зображення принципу вимірювання рівня води в установках і обчислення об'єму їх заповнення.

Після підготовки установок, приготування розчину та висадки насіння салату, ми регулярно спостерігали за ростом і станом рослин в обох системах, записуючи отримані результати для подальшого аналізу.

Для чистоти експерименту освітлення усіх досліджуваних груп рослин проводилося світлодіодними лампами однієї моделі - LightMaster LC-76 LED, потужністю 54 Вт. Колірна температура світла ламп - 6500 К, світловий потік - 4400 люмен.

Наші щоденні спостереження включали в себе оцінку росту рослин, що включала в себе візуальний моніторинг та вимірювання середньої довжини листових поверхонь. Крім того, під час періодичного обслуговування систем, проводилися вимірювання рівня рН та електропровідності розчину в обох системах, щоб переконатися, що умови для рослин були стабільними.

Після періоду культивування довжиною 60 днів, рослини вилучалися з установок і поверхнево оглядалися на наявність симптомів захворювань кореневої системи і листового апарату. Крім того, після вилучення візуально оцінювали розміри кореневої системи, а потім вимірювали масу відрізаних коренів (як у свіжому стані, так і після триденної сушки у термостаті при 50°C).

## 2.2. Отримання та виділення мікоризи

Під час етапу модельних досліджень було встановлено, що оптимальною для вирощування культурою є салат листовий сорту "Австралійський", а найбільші показники біомаси кореневої системи були отримані під час вирощування рослин у гідропонних установках типу DWC, при використанні режиму водного живлення, коли додавання поживного розчину здійснювали після зниження рівня рідини до мінімуму. Проте для перевірки впливу рівня поживного розчину у культивацийному контейнері на кількість утвореної мікоризи (і кінцевих цільових біотехнологічних продуктів — пропагул мікоризних грибків, в першу чергу спор) було прийнято рішення використовувати режими водного живлення, під час яких додавання поживного розчину здійснювалося при зниженні об'єму рідини в установці до 25% і 50% на доповнення до обраної групи, що під час попередніх досліджень показала максимальну ступінь коренеутворення (в якій додавання поживного розчину виконувалося після зниження рівня рідини до нуля). (Більш детально результати дослідження розглядаються у третьому розділі, п. 3.1.3.).

Оскільки під час взаємодії симбіотичних мікробіомних угруповань у ризосфері може спостерігатися ефект "зайнятого місця" (коли мікроорганізми, що вже знаходяться у ризосфері, конкурують із іншими мікроорганізмами за можливість займати свою екологічну нішу, більш вигідну за рахунок доступу до ресурсів рослини-хазяїна), необхідно забезпечити ретельну поверхневу стерилізацію насіння перед його інокуляцією.

Для поверхневої стерилізації насіння була використана стандартна біотехнологічна методика. Спочатку готували розчин стерилізатора, який складався з 3 частин дистильованої води і 1 частини препарату "Білізна," що містить гіпохлорит натрію. Також приготували розчин 70% етилового спирту, змішуючи невелику кількість етилового спирту і дистильованої води в пропорції близько 7 до 3.

Насіння салату перед стерилізацією перевіряли для видалення нежиттєздатних, ушкоджених або хворих насінин. Потім поміщали насіння в

марлевий мішечок і промивали його спочатку проточною водопровідною водою, потім мильним розчином і знову проточною водою. Насіння занурювали в розчин 70% етанолу на 3 хвилини, після чого переносять в склянку із стерилізатором і залишають на 20 хвилин. Після цього насіння тричі, кожного разу на протязі 10 хвилин, промивали в стерильній воді і переносили в пробірки із мікоризним препаратом.

Після поверхневої стерилізації насіння інокулювалося *R. irregularis* (у формі готового комерційного препарату "GreatWhite Granular 1", країна виробництва — США, рис. 2.4.) шляхом простого поверхневого нанесення препарату. За рахунок вмісту у складі біопрепарату абразивних речовин рослини можливо інокулювати шляхом простого поверхневого нанесення препарату (що набагато зручніше описаних у літературних джерелах старих методів, коли інокуляція насіння займала тривалий час і могла виконуватися тільки за спеціально створених умов). Контрольну групу не інокулювали.



Рис. 2.4. Препарат на основі *R. irregularis* "GreatWhite Granular 1" (упаковка і фото субстрату крупним планом).

Перед висадкою інокульованого насіння до гідропонних установок вони піддавалися усім підготовчим етапам за вже описаною у попередніх розділах послідовністю. Але окрім стандартної підготовки, для зниження ймовірності небажаної контамінації ростового субстрату його додатково стерилізували наступним чином: спочатку обидва субстрати (стандартизовані блоки з базальтової вати і керамзит) промивали великою кількістю водопровідної води. Мінеральну вагу стерилізували шляхом кип'ятіння упродовж 15 хвилин. Керамзит готували для вирощування наступним чином: спочатку керамзит промивали великою кількістю проточної води, щоб позбавитися від механічних забруднювачів і уламків різного розміру. Після цього керамзитний субстрат також піддавали кип'ятінню в металічному посуді впродовж 5 хвилин.

Після усіх необхідних підготовчих маніпуляцій (промивки установок і їх поверхневої стерилізації, підготовки поживного розчину і наповнення ним культивацийних контейнерів, стерилізації субстрату) насіння висаджувалося до субстрату за стандартною методикою. Перед висадкою проводили додаткову перевірку роботи усіх систем гідропонних установок (аераційної та освітлювальної). Після висадки інокульованих стартовою кількістю *R. irregularis* насінин до гідропонних установок їх вмикали.

Після посадки здійснювали щоденний візуальний моніторинг стану рослин та ступеня наповнення культивацийних контейнерів поживним розчином. Наповнення установок поживним розчином здійснювали згідно розподілу на дослідні і контрольну групу.

Вплив режиму водного живлення на ефективність утворення мікоризи і пропагул (в першу чергу спор) досліджували на 10-ти зразках (3 установок по три повторності + одна контрольна установка) наступним чином — першу установку заповнювали поживним розчином тільки після часткового висихання, другу — після зниження об'єму рідини до 25%, а третю — після зниження об'єму до 50%.

Контрольна група заповнювалася аналогічним за вмістом мінеральним сполуком розчином, після зниження його об'єму до 50% від максимального визначеного.

За максимальний, 100%-й, об'єм поживного розчину приймали рівень води, що відповідає 65% від загального об'єму установки, який приблизно відповідає нижній межі культивацийних ємностей.

Кожна установка містила по 8 рослин.

Для освітлення усіх досліджуваних груп рослин використовувалися однакові лампи - LightMaster LC-76 LED, потужністю 54 Вт. Колірна температура світла ламп - 6500K, світловий потік - 4400 люмен.

Після закінчення вегетаційного періоду довжиною 60 днів, проводили вимірювання маси відрізаної кореневої системи (як у свіжому стані, так і після сушки у термостаті при 40°C впродовж двох діб).

Для підрахунку кількості спороутворення була з кожної дослідної групи була відібрана наважка перетертих у ступці до стану дрібного порошку сушених коренів вагою 1 грам.

Наважку сухого перетертого коріння просіювали через побутове сито із розміром отворів ~1 мм, поміщали у центрифужні пробірки з дистильованою водою і проводили центрифугування впродовж трьох хвилин за прискоренням

Після видалення залишків води осад розчинявся в 15 мл концентрованого розчину цукрози (500 г/л) і додатково центрифугувався впродовж трьох хвилин за прискоренням 250 g.

Після повторного центрифугування центрифугат вилучався з пробірок, пропускався крізь сито із розміром отворів 38 мкм (400 mesh у позасистемних одиницях).

Один мілілітр отриманої рідини поміщали на предметне скельце і проводили підрахунок спор за допомогою мікроскопу Sigeta MicroGlass 40x R/T збільшенням 40x, після чого проводили перерахування кількості спор в одному мілілітрі центрифугату у вміст спор в одному грамі сухих коренів.

Для перевірки життєздатності спор, отриманих на коренях досліджуваних рослин, висушений біологічний матеріал (коріння рослин), змішаний з мікроабразивною речовиною, використовували для інокуляції рослин і проводили мікроскопічне дослідження коріння рослин.

Для покращення адгезії спор до поверхні насіння шляхом нанесення мікроскопічних подряпин у якості мікроабразивної речовини використовували порошок карбиду кремнію (SiC) фракції F-600 (M10), середній розмір гранул 7-10 мкм, виробник — Washington Millis, Норвегія.

Для стерилізації порошок абразиву попередньо був простерилізований шляхом сухого прокалювання за 300°C впродовж 1 години.

Підготовка рослинного матеріалу до посіву, висадка рослин, культивування та дослідження проводилося за вже описаною вище відпрацьованою методикою (поверхнева хімічна стерилізація насіння, термічна стерилізація субстрату, промивка і стерилізація установки, інокуляція насіння, висадка, культивування впродовж 45 днів, збір матеріалу).

Інокуляцію контрольної групи не проводили, одразу висаджуючи простерилізоване насіння до гідропонних установок.

Мікроскопічне дослідження тонких зрізів кореневої системи проводилося за збільшення  $\times 100$  після забарвлення зразків метиленовим синім і промивки спиртом.

### 3.1. Аналіз експериментальних даних

Після виконання експериментальних лабораторних досліджень усі отримані дані були проаналізовані (в тому числі за допомогою методів математичної статистики).

Аналіз результатів відбувався послідовно, оскільки кожний наступний етап експериментального дослідження так чи інакше спирався на результати попереднього. Так, спочатку проводили вибір найбільш оптимальної культури для подальшого вирощування і отримання мікоризи, потім відбувався вибір конструкції гідропонної установки для вирощування рослин, після цього визначалися оптимальні параметри культивування рослин у даній установці, які б дозволили збільшити вихід кінцевого біотехнологічного продукту (біомасу кореневої системи рослин). На основі отриманих даних проводилися спроби отримання мікоризи у гідропонних установках і виділити її у якості кінцевого продукту (пронагул, в першу чергу — спор мікоризних грибків).

#### 3.1.1 Відбір культури-мікотрофа

Після виконання експериментальних лабораторних досліджень усі отримані дані були проаналізовані (в тому числі за допомогою методів математичної статистики).

Показники температури і вологості повітря, що фіксувалися за допомогою пристроїв електронної фіксації (термогігрометри DHT11 (V2) у кількості трьох штук, підключені до мікроконтролера ESP-8266 у форм-факторі NodeMCU v2) і архівувалися у форматі он-лайн, були використані для аналізу того, наскільки рівномірні показники температури і вологості повітря всередині гідропонної установки.

Загалом було проведено 1440 вимірювань температури і вологості повітря (60 діб \* 3 датчики \* 8 вимірювань на добу), аналіз проводився з метою встановлення відмінностей між показниками трьох датчиків кожного вимірювання, а також визначення загальних відмінностей середньої температури

і вологості впродовж 60 діб. Середня температура для всіх 1440 вимірювань становила  $16.2^{\circ}\text{C}$ , середня відносна вологість повітря —  $83.6\%$ .

Для визначення відмінностей між показниками вимірювань кожного з трьох датчиків було використано відсоткову різницю між максимальним і мінімальним показниками для кожного вимірювання. Відмінність між трьома показниками в кожному вимірюванні не перевищувала  $8\%$  і  $11\%$ , що свідчить про однорідність температури і вологості повітря всередині установки.

З метою визначення загальних відмінностей між середньодобовими показниками за 60 діб вимірювання, було використано критерій середньоквадратичного відхилення (стандартного відхилення). Результати показали, що відмінності між шістьдесятьма значеннями не перевищували  $13\%$  від середньої температури  $16.2^{\circ}\text{C}$  і  $16\%$  від середньої відносної вологості  $83.6\%$ . Це свідчить про стабільність показників температури і вологості повітря в межах всього набору даних.

Отже, на основі проведеного математичного аналізу можна зробити висновок, що вимірювання температури і вологості повітря мають невеликі відмінності як між результатами вимірювань на трьох незалежних термогігрометрах в кожному вимірюванні, так і між усіма 60 вимірюваннями загалом. Це підтверджує рівномірність температури і вологості в середині гідропонної установки.

Проте не зважаючи на однорідність температури і вологості повітря всередині установки, що знаходилися в оптимальних межах для росту і розвитку більшості досліджуваних культур на етапі модельних експериментів, а також висадку рослин в однаковий субстрат (Рис. 3.1.) культури показали високу неоднорідність продуктивності під час росту, яку можна було спостерігати візуально.

НУБІП України



Рис 3.1. Культивацийні ємності з висадженим на субстрат насінням

Після вилучення рослин з гідропонних установок і промивки від залишків субстрату проводили вимірювання біомаси кореневої системи. Через необхідність використання кореневої системи рослин у якості джерела для отримання біотехнологічного продукту – спор *R. irregularis*, межею кореневої системи вважали місце відгалуження перших коренів, і відділення кореневої системи від рослини проводили саме по цій умовній лінії.

Біомасу кореневої системи Коріандру посівного (кінзи, *Coriandrum sativum*), Меліси лікарської (*Melissa officinalis*), М'яти перцевої (*Mentha piperita*), Базиліку відсоток схожості насіння (рис. 3.2.).



Рис 3.2. Вегетація рослин, 20 днів з моменту висадки.

Перед вимірюванням біомаси відрізаної кореневої системи проводили її промивання проточною водою, після чого коріння струшувалося для видалення зайвої води.

Під час аналізу ваги свіжої біомаси кореневої системи дослідних рослин основними показниками для порівняння різних культур було обрано середнє значення біомаси для рослин одного виду в усіх послідовностях, для визначення загального обсягу отриманого у перспективі біотехнологічного продукту (мікоризи), а також дисперсію між усіма дослідними рослинами однієї групи в усіх трьох послідовностях. Через необхідність отримання стабільного результату в процесі біотехнологічного виробництва важливим фактором є не тільки середні показники біомаси, а й однорідність обсягу отриманих продуктів.

Показники середньої біомаси кореневої системи наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Середня біомаса кореневої системи і дисперсія ваги.

Досліджувана культура	Середня вага кореневої системи [г]	Дисперсія [г <sup>2</sup> ]
Салат ендивій кучерявий ( <i>C.</i>		
Салат посівний листовий ( <i>L.</i>		
Салат посівний головковий		
Салат посівний ромен ( <i>L.</i>		
Любисток лікарський ( <i>L.</i>		
Салат японський (мізуна, <i>B.</i>		
Для салату посівного листового ( <i>L. sativa</i> var. <i>secalina</i> ) сорту “Австралійський”; отримана в усіх трьох послідовностях середня біомаса кореневої системи складає 11.67 грама. Для салату посівного головкового ( <i>L.</i> ) сорту “Айсберг”; середня біомаса кореневої системи в усіх послідовностях складає 12.84 грама.		
Крім того, високі середні показники біомаси, наближені між собою, мають Салат ендивій кучерявий ( <i>C. endivia</i> ) сорту “Фрізе зелений” і Любисток лікарський ( <i>L. officinale</i> ) — 10.59 і 10.44 грами відповідно.		
Як видно з загальної таблиці, <i>L. sativa</i> сорту “Айсберг” має не тільки найвищі показники середньої біомаси кореневої системи (12.84 грами), але й також найвищу дисперсію біомаси коріння (дисперсія 2.423 г <sup>2</sup> , при цьому найбільша і найменша вага кореневої системи відрізнялися більше ніж у півтора рази — 9.2 і 15.8 г). Така неоднорідність може слугувати підтвердженням численних згадок у різних джерелах про вибагливість сорту “Айсберг” до умов вирощування (за недотримання яких можлива навіть повна відсутність кондиційного врожаю, деформації листової розетки, тощо).		
Наомість, <i>L. sativa</i> сорту “Австралійський” має не тільки високі показники біомаси (вага свіжих коренів уступає лише сорту “Айсберг” із результатом 11.66		

грамми), але й високу однорідність біомаси коренів отримуваних рослин (дисперсія  $1.45 \text{ g}^{-2}$ )

Тому у якості основної культури-мікотрофа для отримання і подальшого виділення мікоризи було обрано саме Салат північний листовий (*L. sativa* var. ) сорту “Австралійський”.

### 3.1.2 Вибір типу гідропонної установки

Після виконання експериментальних досліджень для порівняння ефективності гідропонних установок типів NFT (Рис. 3.3.) і DWC (Рис. 3.4.) отримані дані (як числові, так і фактичні експериментальні) порівнювалися між собою.



НУБІП України

НУБІП України

Рис. 3.3. Проростки *L. sativa* у гідропонних установках типу NFT



Рис. 3.4. Проростки *L. sativa* у гідропонних установках типу DWC

Основним обчислюваним показником, на який звертали увагу під час аналізу даних, є середня біомаса кореневої системи в установках різних типів.

Перед вимірюванням ваги свіжої кореневої системи проводили її промивання проточною водою, після чого коріння струшувалося для видалення зайвої води.

При цьому однією з основних переваг систем DWC є більша продуктивність утворення кореневої біомаси порівняно з установками типу NFT. Дослідження показують, що середня маса свіжих і висушених коренів у DWC становить 8.62 і 2.12 грами, в той час як у системі NFT ця маса складає лише 7.37 і 1.80 грамів відповідно. Це свідчить про те, що DWC сприяє більшому розвитку коріння, що, в свою чергу, впливає на збільшену ефективність всмоктування поживних речовин.

Однією з основних причин більшої продуктивності нарощування кореневої біомаси в гідропонних установках типу DWC на нашу думку є те, що у системах DWC корені рослин можуть заповнювати весь об'єм установки (коренева сітка здатна рости і змінювати форму в усіх трьох вимірах). Натомість, у гідропонних системах типу NFT, корені розташовуються тонким плоским шаром вздовж площини жолобу для стоку поживного розчину, а росту коріння вверх або вниз заважає сама конструкція установки (потік води спеціально направляє тонким шаром для забезпечення газообміну між повітрям і рідиною). Таким чином, в установках типу DWC корені мають більше простору для зростання без обмежень. У системі NFT корені різних рослин можуть конфліктувати та заважати одне одному, що може призвести до зниження продуктивності.

Наступною проблемою, пов'язаною з системами NFT, є нерівномірний розподіл поживних речовин. На системах великої довжини, наприклад, 7-10 метрів, корені рослин, розташованих ближче до вводу поживного розчину, можуть всмоктувати значну частину поживних речовин, і до останніх рослин мінеральні солі можуть не доходити в достатній кількості. Це призводить до нерівномірного росту і розвитку рослин, що в свою чергу впливає на загальну продуктивність системи.

Крім того, хоча в системах NFT відкритого типу кращий газообмін між поживним розчином і повітрям, існує ризик розвитку ціанобактерій через доступ прямих променів потужного штучного освітлення. Ціанобактерії можуть конкурувати з рослинами за поживні речовини і світло, що може призвести до зниження врожаю і якості продукції. Окрім цього, надмірний розвиток

ціанобактерії у поживному розчині здатний призводити до порушення роботи рухомих частин у контурі циркуляції води і аераційних систем.

Гідропонні системи типу NFT містять в своїй конструкції більшу кількість деталей, особливо — рухомих компонентів (насосів, систем рециркуляції води, тощо), що збільшує ризик поломок і вимагає більше зусиль для обслуговування порівняно з системами DWC. У випадку несправностей у системі рециркуляції води або насосів в установках NFT подача поживного розчину до рослин припиняється повністю, а коренева система опиняється на відкритому повітрі і може висохнути.

Крім того, для коректної роботи гідропонних систем типу NFT необхідно забезпечити протікання по жолобу тонкого шару води, що вимагає більш точного юстування усієї конструкції під час монтажу.

Однією з ключових конструкційних переваг установок типу DWC є здатність до оптимізації ефективного нарощування кореневої біомаси шляхом простої зміни частоти заповнення установок поживним розчином. В системах NFT такий підбір вимагає використання більш складних і дорогих рішень, використання мікроконтролерів, електромагнітних клапанів та реле для керування циклом поливів.

Таким чином, гідропонні системи типу DWC мають декілька переваг порівняно з системами NFT. Вони забезпечують більшу продуктивність завдяки кращому розвитку коренів і розподілу поживних речовин. Крім того, DWC виявляють меншу кількість експлуатаційних ризиків, таких як розвиток ціанобактерій і ймовірність виходу обладнання з робочого стану.

Враховуючи ці фактори, на період основної частини експериментальних досліджень було прийнято рішення використовувати гідропонні системи типу DWC для отримання кінцевих біотехнологічних продуктів (мікоризи та її похідних), спочатку визначивши найбільш оптимальні експлуатаційні параметри установок для збільшення темпів нарощування кореневої біомаси рослин.

### 3.1.3. Вибір частоти наповнення установок

Оскільки періодичне вилучення коріння рослин з поживного розчину може стимулювати розвиток кореневої системи, для підвищення швидкості нарощування біомаси кореневої системи, було досліджено вплив частоти заповнення гідропонних установок на швидкість росту коренів (Рис. 3.5). З іншого боку, важливо не допустити надмірної тривалості фази, коли коріння знаходиться не у поживному розчині, щоб не викликати пригнічення росту рослин через дефіцит води.



Рис. 3.5. Дослідження впливу частоти заповнення установок на швидкість росту коренів, коренева система рослини крупним планом.

Під час дослідження використовувалися гідропонні установки типу DWC, що були відібрані на попередньому етапі досліджень як найбільш перспективні. Через активне випаровування води з листової поверхні та верхнього шару зволоженого керамзитного субстрату, штучне вливання поживного розчину з установок не проводили.

В першу дослідну групу заздалегідь приготований поживний розчин потрібної концентрації додавали після зниження рівня рідини до нуля. В другу дослідну групу поживний розчин доливався після зниження об'єму рідини до 25% від максимального рівня, в третю — після зниження до 50%, в четверту — до 75%. П'яту дослідну групу підтримували на максимальному рівні наповнення поживним розчином постійно.

Частота наповнення установок поживним розчином та їх загальна кількість наведені у таблиці 3.2.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Таблиця 3.2. Частота наповнення установок поживним розчином та кількість проведених наповнень.

Таблиця 3.2.

Дослідна група №1 (установка наповнювалася після падіння рівня поживного розчину до мінімуму)

Частота наповнення установки поживним розчином, [діб <sup>-1</sup> ]	Кількість наповнень установки поживним розчином

Дослідна група №2 (установка наповнювалася після падіння об'єму поживного розчину до 25% від максимального рівня)

Частота наповнення установки поживним розчином, [діб <sup>-1</sup> ]	Кількість наповнень установки поживним розчином

Дослідна група №3 (установка наповнювалася після падіння об'єму поживного розчину до 50% від максимального рівня)

Частота наповнення установки поживним розчином, [діб <sup>-1</sup> ]	Кількість наповнень установки поживним розчином

Дослідна група №4 (установка наповнювалася після падіння об'єму поживного розчину до 75% від максимального рівня)

Частота наповнення установки поживним розчином, [діб <sup>-1</sup> ]	Кількість наповнень установки поживним розчином

Дослідна група №5 (об'єм поживного розчину постійно підтримувався на максимальному рівні)

Частота наповнення установки поживним розчином, [діб <sup>-1</sup> ]	Кількість наповнень установки поживним розчином

Після закінчення періоду вегетації довжиною 60 діб, рослини вилучалися з гідропонних установок, а коренева система відрізала за формою культиватійної ємності, промивалася у водопровідній воді і зважувалася двічі

спочатку у свіжому стані, потім — після висушування у термостаті впродовж трьох діб.

Перед вимірюванням свіжої кореневої системи коріння промивалося проточною водою, після чого струшувалося для видалення зайвої води.

Результати вимірювання ваги кореневої системи (середні арифметичні значення) наведені на графіку (Рис. 3.6.).

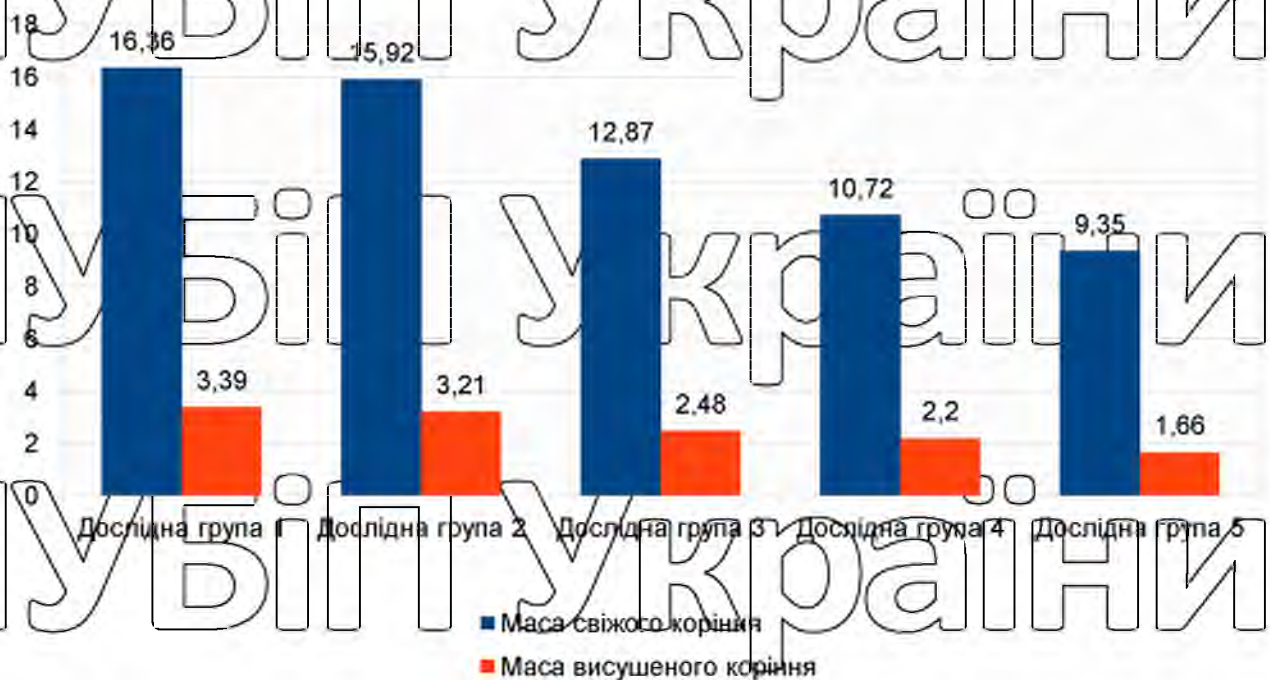


Рис. 3.6. Середня вага свіжої та висушеної кореневої системи.

Як видно з графіку, середня біомаса як свіжої, так і висушеної кореневої системи рослин у групі, де наповнення гідропонних установок здійснювалося лише після повного зниження рівня рідини, є найбільшою. Маса свіжого і висушеного при 50°C коріння становить 16.36 і 3.39 грам відповідно.

Наступною за показниками ваги коріння є група, в якій наповнення установок проводилося після зниження об'єму поживного розчину в культивацийній камері до 25%. Маса свіжого і сухого коріння в цій групі становить 15.92 і 3.21 грам відповідно.

Проте для подальших експериментів по утворенню мікоризи в гідропонних установках використаня лише підходу, аналогічного такому, що був використаний у першій дослідній групі (де наповнення установок поживним

розчином проводилося лише після повного використання рослинами рідини) є неоптимальним.

Під час очікування зниження рівня рідини в установці до мінімального рівня, як і в будь-якому іншому процесі біотехнологічного виробництва, існує ризик допущення виробничих помилок, перебоїв водопостачання, виникнення несправностей в системі водопостачання, тощо. В цьому випадку рослини у гідропонних установках, де рівень води вже знизився до нуля, можуть зазнати значного стресу через зневоднення чи навіть повністю загинути, у випадку тривалої відсутності рідини.

Крім того, такий режим наповнення гідропонних установок рідиною неможливо використовувати для рослин, що мають низьку стійкість до посух, або мободих рослин, що активно і швидко вегетують та потребують постійного притоку поживних речовин і води.

Як показали експерименти, позитивною стороною використання такого режиму є мінімізація ризику забруднення гідропонних установок ціанобактеріями через періодичне зниження рівня рідини і пересихання верхньої частини культиваційної камери.

Тому для проведення основного етапу досліджень після аналізу результатів і урахування ризиків було прийнято рішення поділу дослідних рослин на три групи — із наповненням установки поживним розчином після повного використання попереднього, та із наповненням гідропонних систем поживним розчином після падіння об'єму рідини до 25% і 50%.

#### 3.1.4. Отримання та виділення мікоризи

Під час попередніх етапів були встановлені оптимальні експлуатаційні параметри гідропонних установок для збільшення маси кореневої системи у рослин, вибрана оптимальна культура-мікотроф і визначена ефективна конструкція гідропонної установки, що спростило процес отримання мікоризи на коренях рослин дослідних груп.

Вирощування рослин проводилося за відпрацьованою методикою, але насіння і субстрат додатково стерилізувалися і інокулювалися готовими мікоризними препаратом.

За стандартною, широкоживаною методикою, під час послідовної зміни фаз розвитку рослин (насіння, стадія проростання, стадія проростків, молода рослина, сформована доросла рослина) відбувається повна заміна поживного розчину. При цьому старий розчин повністю вилучають з культивацийного контейнеру, за потребою промивають установку і наповнюють свіжим розчином.

Повна заміна поживного розчину у цьому випадку обумовлена по-перше, зміною рівня рН і сольового складу старого розчину, по-друге — накопиченням у розчині органічних метаболітів, що у перспективі можуть відігравати роль поживних субстратів і сприяти розвитку патогенної мікрофлори. Додатковою причиною повної заміни поживного розчину є розвиток синьо-зелених водоростей в поживному розчині під час культивації рослин у гідропонних установках в умовах штучного потужного освітлення. Крім того, рослини на різних стадіях розвитку потребують різної концентрації поживних речовин для забезпечення нормального перебігу ростових процесів.

Проте під час повної заміни поживного середовища існує ризик пошкодження кореневої системи або контамінації культивацийного контейнеру патогенними мікроорганізмами. Саме тому для мінімізації шансу випадкового пошкодження кореневої системи або небажаної контамінації внутрішнього простору гідропонної установки патогенними мікроорганізмами повної заміни поживного розчину не проводилося. Натомість, після зниження рівня рідини в культивацийній камері до рівня, визначеного мінімальним для даної дослідної групи, рівень розчину доводили до потрібного шляхом донаповнення установки. Після цього коригували рівень рН шляхом додавання ортофосфornoї кислоти у поживну суміш.

Контрольна група після поверхневої стерилізації не інокулювалася.

Для оцінки впливу частоти заповнення установок поживним розчином на продуктивність утворення спор *R. irregularis* було виміряно масу кореневої системи та кількість спор на них.

Після завершення періоду вегетації довжиною 60 днів, вимірювалася маса кореневої системи (як одразу після вилучення рослин і промивання проточною водою, так і після сушки у термостаті при 40°C впродовж двох діб).

Перед вимірюванням біомаси кореневої системи після зрізання коріння промивалося проточною водою для видалення залишків гідропонного субстрату, після чого струшувалося для видалення надлишкової вологи.

Менша тривалість періоду сушки коріння і використання меншої температури використовувалися для збереження *R. irregularis* у життєздатному стані.

Середня маса кореневої системи дослідних груп представлена на графіку

(Рис. 3.7.).

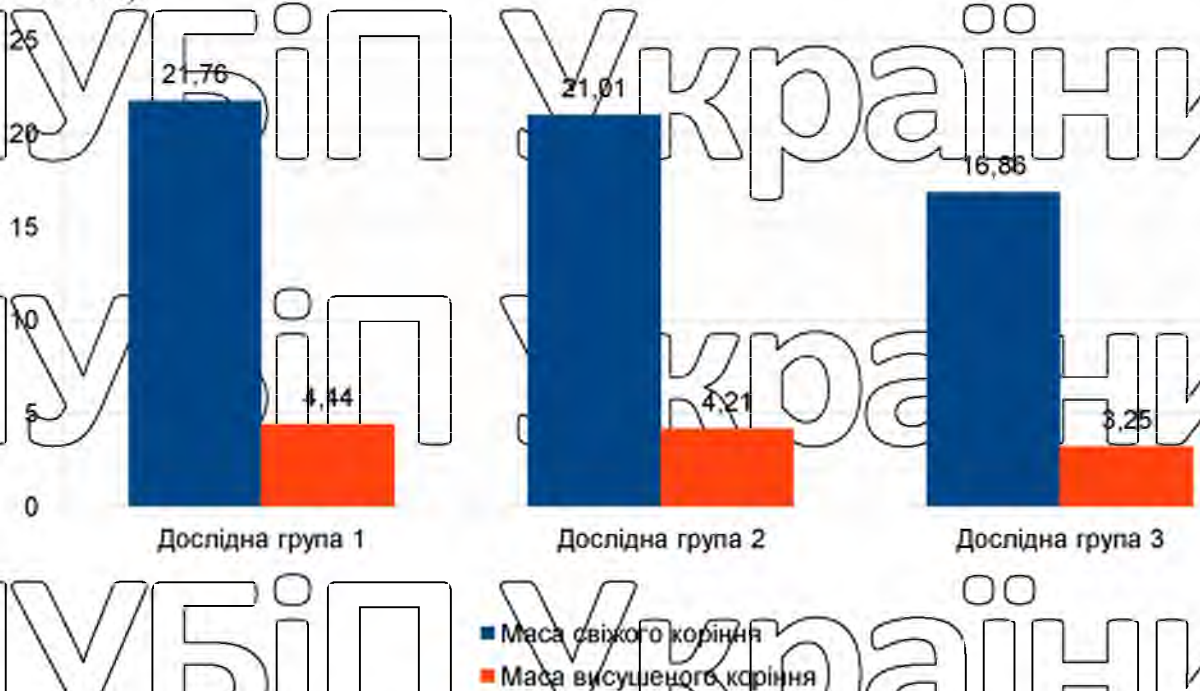


Рис. 3.7. Маса свіжої та висушеної кореневої системи (середні значення).

Після визначення маси висушеної кореневої системи проводили визначення кількості спор мікоризного гриба за стандартною методикою. Для полегшення підрахунку під чашку Петрі на час маніпуляцій підкладався масштабно-

координатний лист паперу для креслення, і розрахунок спор проводили по квадратах.

Результати підрахунку кількості спор перераховувалися в концентрацію спор на один грам висушених коренів рослини.

Результати визначення (округлені до цілих чисел) представлені на графіку

(Рис. 3.8.).

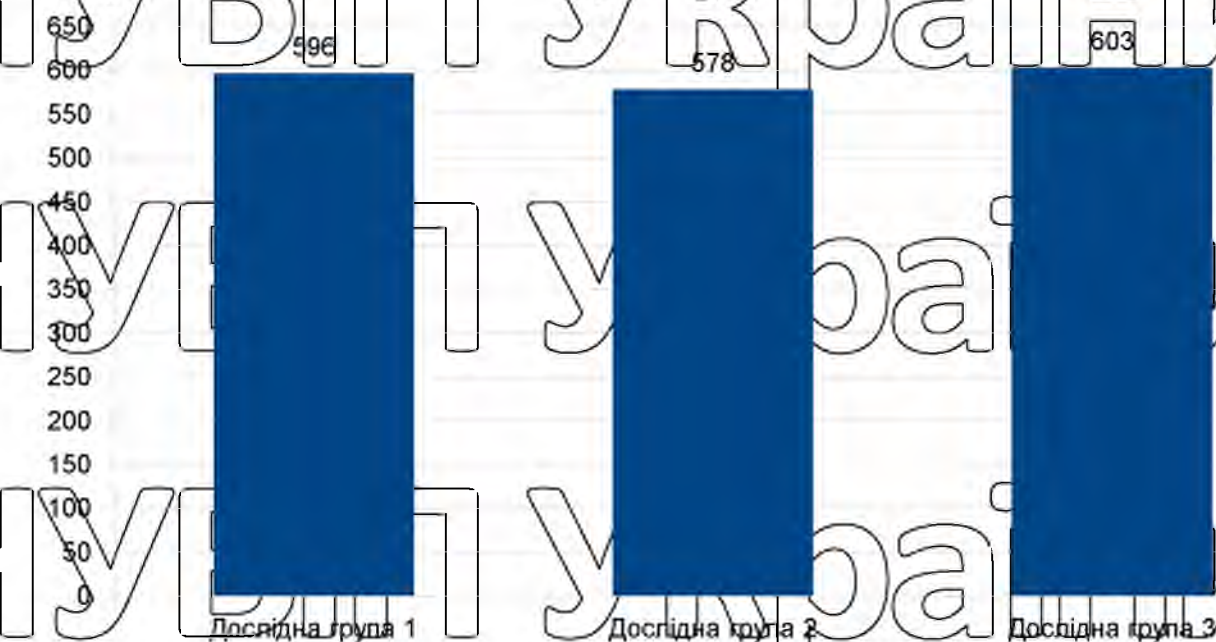


Рис. 3.8. Графік вмісту спор в 1 грамі сухої речовини кореня

Контрольна група під час мікроскопічного дослідження кореневої системи показала відсутність вмісту спор чи від ендомікоризних грибів. Для проведення візуальної мікроскопічної оцінки утворення м.коризи в контрольній групі використовувалося забарвлення метиленовим синім.

У першій групі рослин установку заповнювали поживним розчином після зниження рівня рівня рідини до 0. За таких умов волога маса коренів варіювала у середньому від 21.54 г до 21.95 г, а суха маса - від 4.13 г до 4.60 г. Концентрація спор на 1 г сухої речовини було встановлено на рівні 584-602 спор/г.

У другому варіанті експерименту, де гідропонна установка заповнювалася поживним розчином після зниження об'єму рідини до 25% від максимального, маса свіжих коренів варіювала у середньому у межах 21.25-23.55 г, а суха маса

у межах від 3.86 до 4.17 г. Показник утворення спор коливався від 569 до 595 спор/г.

Третя група, що отримувала свіжий поживний розчин після зниження рівня заповнення установки до половини від загального об'єму, показала результати на рівні 16.38-18.56 грамів біомаси свіжих коренів і 2.9-3.5 грамів маси висушених коренів. Концентрація спор за результатами підрахунку центрифугованої витяжки з висушеного коріння була визначена на рівні 592-619 спор на один грам вихідної сировини.

Для оцінки різниці між групами проведено статистичний аналіз тестом ANOVA та пост-хок аналізом за допомогою тесту Т'юкі (Додаток А). Встановлено статистично достовірну різницю на рівні  $p < 0.05$  у вологій та сухій масі коренів салату (таблиця 3.3.). Подальший аналіз показав, що саме третя група, де середовище додавалось після зниження рівня рідини до 50%, мала статистично достовірну відмінність. З іншого боку, не знайдено статистичної різниці між різними групами за концентрацією спор.

Таблиця 3.3. Результати аналізу ANOVA за кожною із досліджених змінних

Змінна	Критерій Фішера	p-значення
Волога маса		
Суха маса		
Концентрація спор		

Отримані результати свідчать, що режим наповнення гідропонної установки дуже важливий для росту коренів, але не для росту мікоризного гриба. Періоди без поживного середовища чи з низьким його рівнем спричиняють нестачу поживних елементів для рослини. Як відповідь, у пошуку поживних сполук рослина активує ріст кореневої системи. За постійної присутності середовища цього не відбувається.

З іншого боку, рослина не здатна активувати ріст мікоризного грибка в умовах нестачі поживних елементів, тому що концентрація спор не змінювалась залежно від гідропонної системи. Іншим поясненням цього явища може бути пригнічення росту гриба нестачею вологи.

Через низьку розбіжність у показниках вмісту кількості спор в одному грамі коренів, основним фактором для підвищення ефективності біотехнологічного процесу отримання мікоризи на коренях інокульованих рослин, а також пропагул мікоризних грибів, є збільшення біомаси кореневої системи вирощуваних рослин.

Перевірка життєздатності отриманого матеріалу *G. intraradices* (R. пропагули, утворені на кореневій системі *Z. sativa* сорту "Австралійський", зберігають життєздатність та можуть бути використаними для інокуляції нових рослин, а тому описана методика може бути використана для біотехнологічного виробництва мікоризних інокулянтів.

Мікоризи чи навіть поодинокі гіфи в контрольній групі, де насіння не інокульовалося біоматеріалом, виявлено не було.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВИСНОВКИ

1. Під час першого етапу попередніх досліджень було отримано дані про середню масу кореневої системи, необхідні для вибору найбільш продуктивної культури для отримання цінного біотехнологічного продукту (пропагул, в першу чергу спор, ендомікоризного гриба *R. irregularis*).

На початку дослідження до гідропонної установки було висаджено насіння 14 культур, а саме Салату посівного листового (*L. sativa* var. *secalina*) сорту “Австралійський”, Салату ендівію кучерявого (*C. endivia*) сорту “Фрізе зелений”, Салату посівного головкового (*L. sativa* var. *capitata*) сорту “Айсберг”, Салату посівного ромен (*L. sativa* var. *romana*), Коріандру посівного (кінзи, *C. перцевої* (*M. piperita*), Любистку лікарського (*L. officinale*), Салату японського (мізуни, *B. rapa* ssp. *nipposinica*) сорту “Зелений”, Базиліку (*O. basilicum*) сорту “Зелений”, Руколи (*E. vesicaria*) сорту “Пікантна”, Щавелю шпинатний (*R. “Амброзія”*, Шпинату новозеландського (*T. tetragonoides*) сорту “Тетрагонія”.

Біомасу Коріандру посівного (кінзи, *C. sativum*), Меліси лікарської (*M. Шпинату новозеландського (*T. tetragonoides*) не вдалося визначити через малі розміри рослин і низький відсоток схожості насіння. Це унеможливило використання даних культур у якості джерела для отримання мікоризи *R.**

З інших досліджуваних культур салат *L. sativa* сорту “Айсберг” мав найвищі показники середньої біомаси кореневої системи (12.84 грамів), але водночас найбільшу неоднорідність розмірів отримуваних рослин (як кореневої системи, так і надземної частини рослини). Дисперсія ваги кореневої системи становила 2.423 г<sup>2</sup>, при цьому найбільша і найменша вага кореневої системи відрізнялися більше ніж у півтора рази — 9.2 і 15.8 г. Через необхідність отримання у гідропонних установках у якості кінцевого біотехнологічного продукту не тільки

мікоризних грибів, а й рослин однакового розміру і привабливого товарного вигляду, у якості рослини-хазяїна для культивування мікоризних грибів у подальших експериментах вирішено використовувати *L. sativa* сорту “Австралійський”, мав не тільки високі показники біомаси (вага свіжих коренів уступала лише сорту “Айсберг” із результатом 11.66 грами), але й високу однорідність біомаси коренів отримуваних рослин (дисперсія 1.15 г<sup>2</sup>).

2. Під час порівняння між собою продуктивності нарощування біомаси коріння в гідропонних установках двох типів — DWC та NFT, було визначено, що рослини, вирощені в установках типу DWC, мали більшу продуктивність утворення кореневої біомаси порівняно з установками типу NFT. Середня біомаса свіжих і висушених коренів у DWC становила у 8.62 і 2.12 грами, в той час як у системі NFT ця маса складала 7.37 і 1.80 грамів відповідно. Цей факт можна пояснити тим, що у гідропонних системах типу DWC коріння може рости в усіх напрямках,

в тому числі вгору та вниз, заповнюючи весь об’єм гідропонної установки. В той же час коріння рослин у системах NFT з боків та знизу обмежено розміром жолоба, а зверху — товщиною шару води, що протікає по ньому. Збільшити товщину шару поживного розчину, що циркулює у системі, без падіння продуктивності вирощування неможливо, оскільки тільки тонкий шар рідини здатний забезпечувати необхідний для активно вегетуючих рослин газообмін.

3. Крім того, оскільки періодичне вилучення коренів з поживного розчину може стимулювати їх розвиток, у системах типу DWC можливо додатково посилювати нарощування біомаси кореневої системи шляхом простого регулювання частоти заповнення гідропонних установок.

Дане явище було досліджено у п’яти дослідних групах. Першу групу заповнювали поживним розчином тільки після повного використання рослиною попередньої порції, установки другої, третьої та четвертої дослідних груп заповнювали після зниження об’єму поживного розчину до 25%, 50% і 75% відповідно, а установки з п’ятої дослідної групи постійно підтримували у стані максимального наповнення.

Після аналізу результатів було виявлено, що найбільшу масу кореневої системи мали рослини, що росли в установках з першої дослідної групи (де наповнення свіжим розчином проводилося тільки після зниження рівня рідини до нуля). Середня маса свіжого і висушеного коріння становила 16.36 і 3.39 грам відповідно.

Проте після оцінки численних ризиків, що можуть бути пов'язаними з періодичним пересиханням установок (можливість допущення виробничих помилок, виходу з ладу обладнання, тощо) було прийнято рішення у подальших експериментах використовувати режими заповнення установок після падіння

об'єму рідини до 25% і 50%. Крім того, необхідно було дослідити вплив періодичного пересихання на продуктивність утворення спор ендомікоризним симбіонтом *R. irregularis* у подальших експериментах. Вага кореневої системи (середнє арифметичне) в цих групах становила 15.92 і 12.87 грамів для свіжих коренів і 3.21 і 2.48 для висушених відповідно.

4. Під час основної частини експериментальних досліджень була показана можливість утворення мікоризи *R. irregularis* на коренях *L. sativa* сорту "Австралійський". Дослідні рослини були розділені на 3 групи в залежності від частоти заповнення установки поживним розчином (установки з першої

дослідної групи заповнювали тільки після повного використання рослинами попереднього розчину, другу і третю — після зниження об'єму рідини в установках до 25% і 50% відповідно).

Найвищі середні показники біомаси як свіжого, так і висушеного коріння очікувано були отримані в першій дослідній групі, де заповнення установок проводилося після повного зниження рівня поживного розчину. За таких умов середня маса коренів варіювала становила 21.76 г, а суха маса - від 4.44 г. Проте за результатами зважування і подальшої статистичної обробки результатів було показано, що друга дослідна група не мала достовірних відмінностей від першої.

Середня вага свіжих висушених коренів у другій групі становила 21.01\4.21 грами відповідно. Третя група мала значно меншу біомасу (16.86\3.25 грами для свіжого\висушеного коріння) і значимо відрізнялася від першої та другої.

Підрахунок кількості спор під мікроскопом та розрахунки концентрації показали, що усі групи не мали статистично значущої різниці між собою. Середній вміст спор для першої, другої та третьої групи становив 596, 578 та 603 спор/г для сухої речовини кореня.

Відсутність значущих розбіжностей у концентрації спор можна пояснити однаковими умовами вирощування та відсутністю стресорів, що впливали б на рослини.

Крім того, усі інокульовані рослини утворювали мікоризу в ході розвитку, що можна пояснити високою концентрацією пропагул у біопрепараті, що використовувався та попередньою поверхневою стерилізацією насіння. Крім того, у якості субстрату у вихідному біопрепараті використовується пісок, і під час інокуляції спори можуть затримуватися у мікроскопічних пошкодженнях на поверхні кореня.

Мікроскопічне дослідження підтвердило відсутність утворення мікоризи рослинами, насіння яких зазнало поверхневої стерилізації, але не було інокульоване.

5. Пропагули, що утворювалися на коренях дослідних рослин, можуть бути використані для інокуляції інших рослин, що створює можливість для впровадження описаного методу у виробництво.

Основним фактором для збільшення виходу кінцевого біотехнологічного продукту є підвищення кореневої біомаси, що може бути здійснене шляхом регулювання частоти додавання поживного розчину до гідропонних установок з рослинами.

При цьому через відсутність різниці між додаванням поживного розчину після повного використання попереднього і додавання розчину після зниження об'єму заповнення установки до 25%, кращим є другий режим живлення, оскільки при збереженні продуктивності утворення кінцевого продукту, він виключає ризики, пов'язані з пересиханням установки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Schleiden M.J. Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik nebst einer methodologischen Einleitung als Anleitung zum Studium der Pflanze: mit 290 eingedruckten Holzschnitten, fünf Kupfertafeln und zwei Registern der Pflanzennamen und Kunstaussdrücke. Engelmann, 1861. 752 p.

2. Reissek S. Gallerie österreichischer Botaniker // Österreichische Botanische Zeitschrift. Springer, 1859. Vol. 9, №1. P. 1–8.

3. Triplett E.W. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots // Plant Soil. 1996. Vol. 186, № 1. P. 29–38.

4. Oviatt P., Rillig M.C. Mycorrhizal technologies for an agriculture of the middle // PLANTS, PEOPLE, PLANET. 2021. Vol. 3, № 5 / P. 454–461.

5. Basiru S., Mwanza H.P., Hijri M. Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculant Benchmarks: 1 // Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 9, № 1. P. 81.

6. Dodd J. Recent advances in understanding the role of arbuscular mycorrhizas in plant production. 1998.

7. Haug I., Oberwinkler F. Some distinctive types of spruce mycorrhizae // Trees. 1987. Vol. 1, № 3. P. 172–188.

8. Koide R.T., Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza // Mycorrhiza. 2004. Vol. 14, № 3. P. 145–163.

9. Declerck S., Strullu D.G., Fortin A. In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer Science & Business Media, 2005. 418 p.

10. Brundrett M. Diversity and classification of mycorrhizal associations // Biological Reviews. Cambridge University Press, 2004. Vol. 79, № 3. P. 473–495.

11. Hause B., Fester T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis // Planta. 2005. Vol. 221, № 2. P. 184–196.

12. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, 2010. 815 p.

13. SCHÜBLER A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // Mycological Research. Cambridge University Press, 2001. Vol. 105, № 12. P. 1413–1421.

14. Vierheilig H., Schweiger P., Brundrett M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots // *Physiologia Plantarum*. 2005. Vol. 125, № 4. P. 393–404.

15. Dalpé Y., Monreal M. Arbuscular Mycorrhiza Inoculum to Support Sustainable Cropping Systems // *Crop Management*. 2004. Vol. 3, № 1. P. 1–11.

16. Cranenbrouck S. et al. Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs // *In Vitro Culture of Mycorrhizas* / ed. Declerck S., Fortin J.A., Strullu D.-G. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. P. 341–375.

17. Ratnayake M., Leonard R.T., Menge J.A. Root Exudation in Relation to Supply of Phosphorus and Its Possible Relevance to Mycorrhizal Formation // *New Phytologist*. 1978. Vol. 81, № 3. P. 543–552.

18. Dickson S. The Arum-Paris Continuum of Mycorrhizal Symbioses // *The New Phytologist*. [Wiley, New Phytologist Trust], 2004. Vol. 163, № 1. P. 187–200.

19. Dickson S., Smith F.A., Smith S.E. Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? // *Mycorrhiza*. 2007. Vol. 17, № 5. P. 375–393.

20. Cavagnaro T.R. et al. Growth and phosphorus nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis // *New Phytologist*. 2003. Vol. 157, № 1. P. 127–134.

21. van Aarle L.M., Olsson P.A. Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi // *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 2003. Vol. 69, № 11. P. 6762–6767.

22. Vahter T. et al. Co-introduction of native mycorrhizal fungi and plant seeds accelerates restoration of post-mining landscapes // *Journal of Applied Ecology*. 2020. Vol. 57, № 9. P. 1741–1751.

23. Kameoka H., Gutjahr C. Functions of Lipids in Development and Reproduction of Arbuscular Mycorrhizal Fungi // *Plant and Cell Physiology*. 2022. Vol. 63, № 10. P. 1356–1363.

24. Bahram M. et al. Structure and function of the global topsoil microbiome: 7717 // *Nature*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 560, № 7717. P. 233–237.

25. Kottke I., Oberwinkler F. Mycorrhiza of forest trees — structure and function // *Trees*. 1986. Vol. 1, № 1. P. 1–24.

26. Silveira A.P.D. da, Cardoso E.J.B.N. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants // *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz,” 2004. Vol. 61. P. 203–209.

27. Carrenho R. et al. The effect of different soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of peanuts, sorghum and maize // *Acta Bot. Bras. Sociedade Botânica do Brasil*, 2007. Vol. 21. P. 723–730.

28. Howeler R.H. Identifying plants adaptable to low pH conditions // *Plant-Soil Interactions at Low pH: Proceedings of the Second International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 24–29 June 1990, Beckley West Virginia, USA* // ed. Wright R.J., Baligar V.C., Murrmann R.P. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. P. 885–904.

29. Cordeiro E.C.N. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi action on the quality of strawberry fruits // *Hortic. Bras. Associação Brasileira de Horticultura*, 2019. Vol. 37. P. 437–444.

30. Mendoza J., Borie F. Effect of *Glomus etunicatum* inoculation on aluminum, phosphorus, calcium, and magnesium uptake of two barley genotypes with different aluminum tolerance // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. Taylor & Francis, 1998. Vol. 29, № 5–6. P. 681–695.

31. Using the Reserves of Macro and Microelements from the Soil by Means of Mycorrhizae | *International Journal of Life Science and Agriculture Research*. 2023.

32. Bertolazi A.A. et al. Linking Plant Nutritional Status to Plant-AMF Interactions // *Plant Microbiome: Stress Response* / ed. Egambardieva D., Ahmad P. Singapore: Springer, 2018. P. 351–384.

33. Folli-Pereira M. da S. et al. Arbuscular mycorrhiza and plant tolerance to stress // *Rev. Bras. Ciênc. Solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 2012. Vol. 36. P. 1663–1679.

34. Silya E.F.L., Moreira F.M. de S., Siqueira J.O. Mn concentration and mycorrhizal colonization in understory native species grown at areas of manganese mine tailings

disposal // International Journal of Phytoremediation. Taylor & Francis, 2019. Vol. 21, № 6. P. 564–576.

35. Rosier C.L., Hoyer A.T., Rillig M.C. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools // Soil Biology and Biochemistry. 2006. Vol. 38, № 8. P. 2205–2211.

36. Méndez D.F.S. et al. Maize Productivity, Mycorrhizal Assessment, Chemical and Microbiological Soil Attributes Influenced by Maize-Forage Grasses Intercropping // Braz. arch. biol. technol. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, 2019. Vol. 62. P. e19170737.

37. Velasco J., Aguirre G., Ortuño N. Liquid humus and microorganisms to promote the production of Lettuce (*Lactuca sativa* var. Crespa) in hydroponic crop // Journal of the Selva Andina Biosphere. 2016. Vol. 4, № 2. P. 71–83.

38. Pons S. et al. Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* // PLOS ONE. Public Library of Science, 2020. Vol. 15, № 10. P. e0240886.

39. Morin E. et al. Comparative genomics of *Rhizophagus irregularis*, *R. cerebriforme*, *R. diaphanus* and *Gigaspora rosea* highlights specific genetic features in Glomeromycotina // New Phytologist. 2019. Vol. 222, № 3. P. 1584–1598.

40. Sieverding E. et al. *Rhizogloium*, a new genus of the Glomeraceae // Mycotaxon. 2015. Vol. 129, № 2. P. 373–386.

41. Campos C. et al. Intra and Inter-Spore Variability in *Rhizophagus irregularis* AOX Gene // PLOS ONE. Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 11. P. e0142339.

42. Maitra P. et al. Sand Particle Size and Phosphorus Amount Affect *Rhizophagus irregularis* Spore Production Using In Vitro Propagated Spore as a Starter Inoculum in Rhizosphere of Maize (*Zea mays*) Plantlets: 10 // Journal of Fungi. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 7, № 10. P. 846.

43. Raj B.M. et al. An optimised in vitro protocol for mass production of *Rhizophagus irregularis* spores for sustainable agriculture // JBR. Academic Journals, 2017. Vol. 9, № 4. P. 21–29.

44. Loján P. et al. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria on root colonization potential and life cycle of *Rhizopagus irregularis* following co-entrapment into alginate beads // *Journal of Applied Microbiology*. 2017. Vol. 122, № 2. P. 429–440.

45. Chen E.C.H. et al. High intraspecific genome diversity in the model arbuscular mycorrhizal symbiont *Rhizopagus irregularis* // *New Phytologist*. 2018. Vol. 220, № 4. P. 1161–1171.

46. van Creijl J. et al. Stochastic nuclear organization and host-dependent allele contribution in *Rhizopagus irregularis* // *BMC Genomics*. 2023. Vol. 24, № 1. P. 53.

47. Lebeda A., Doležalová I., Astley D. Representation of wild *Lactuca* spp. (Asteraceae, Lactuceae) in world genebank collections // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2004. Vol. 51, № 2. P. 167–174.

48. Lebeda A. et al. Wild *Lactuca* Species in North America // *North American Crop Wild Relatives, Volume 2: Important Species* / ed. Greene S.L. et al. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 131–194.

49. Medina-Lozano I., Bertolín J.R., Díaz A. Nutritional value of commercial and traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives: Vitamin C and anthocyanin content // *Food Chemistry*. 2021. Vol. 359. P. 129864.

50. Lebeda A., Doležalová I., Novotná A. Wild and weedy *Lactuca* species, their distribution, ecogeography and ecobiology in USA and Canada // *Genet Resour Crop Evol*. 2012. Vol. 59, № 8. P. 1805–1822.

51. Jones J.B. Hydroponics: Its history and use in plant nutrition studies // *Journal of Plant Nutrition*. Taylor & Francis, 1982. Vol. 5, № 8. P. 1003–1030.

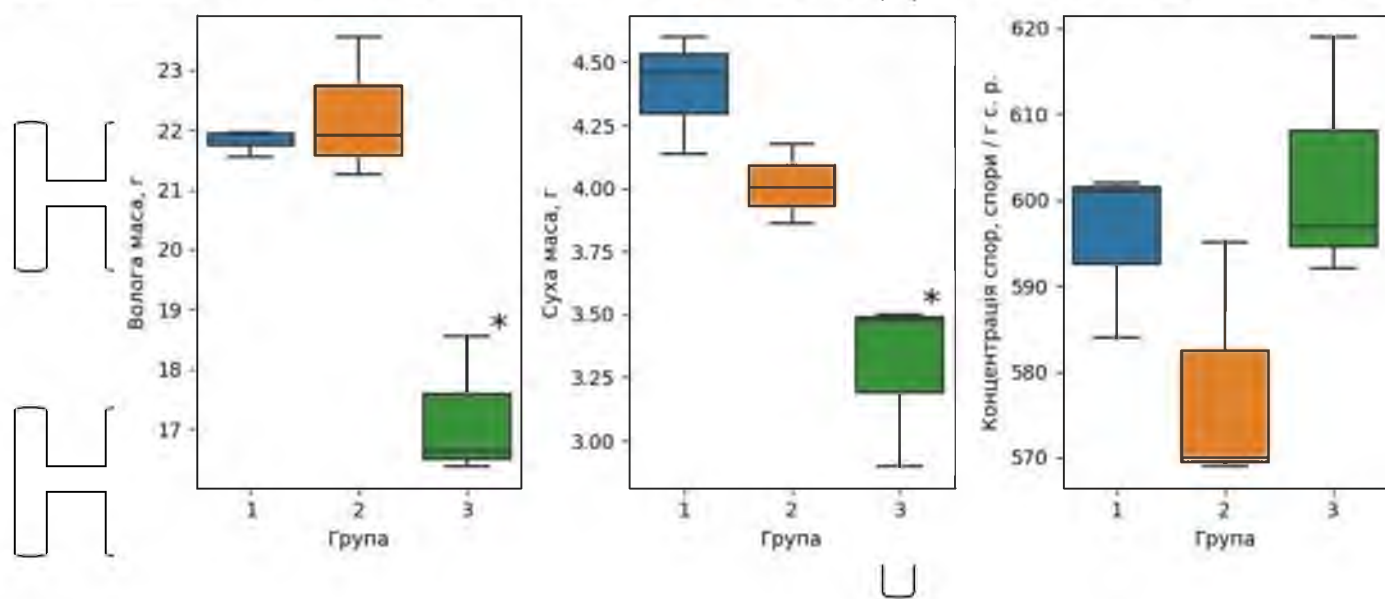
52. Kramer U. Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana* // *eLife* eLife Sciences Publications, Ltd, 2015 / Vol. 4. P. e06100.

53. Saaid M.F. et al. A development of an automatic microcontroller system for Deep Water Culture (DWC) // 2013 IEEE 9th International Colloquium on Signal Processing and its Applications. 2013. P. 328–332.

# НУБІП України

ДОДАТКИ  
Додаток А

## Аналіз розбіжностей маси свіжого і висушеного корення та концентрації спор



НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України