

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І.І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТИТАРЕНКО НАДІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 606:631.461:634(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ
УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО
РОЗМНОЖЕННЯ *RUBUS FRUTICOSUS* L. І *PAULOWNIA TOMENTOSA*
STEUD. З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРООРГАНІЗМІВ

162 «Біотехнології та біоінженерія»

16 «Хімічна та біоінженерія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Н. В. Титаренко

Науковий керівник: Іваниця Володимир Олексійович,
доктор біологічних наук, професор

Одеса – 2023

АНОТАЦІЯ

Титаренко Н.В. Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням мікроорганізмів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» – Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, 2023.

Дисертаційне дослідження присвячене удосконаленню біотехнології мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів на етапі постасептичної адаптації. Для дослідних культур рослин було запропоновано удосконалені технологічні схеми отримання садивного матеріалу від стадії введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro* до стадії отримання адаптованих у закритому ґрунті саджанців.

Мікроклональне розмноження – асептичне культивування рослин *in vitro* з метою швидкої репродукції, що дозволяє оперативно отримувати велику кількість генетично однорідних саджанців із заданими характеристиками. Для підвищення ефективності цього методу необхідно враховувати фізіологічні особливості видів рослин, які розмножують, та удосконалювати стандартні підходи на різних етапах мікроклонування, включаючи постасептичну адаптацію мікроклонів – стадію із великими потенційними втратами рослинного матеріалу.

Ожина звичайна (*Rubus fruticosus* L.) – плодово-ягідна культура, яка стає все більш розповсюдженою в українському садівництві. Найбільш зручними у догляді та зборі врожаю є безколючкові сорти. Мікроклонування дозволяє швидко та безперервно отримувати велику кількість саджанців ожини навіть в умовах невеликих потужностей виробництва. Павловнія повстяна (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) – деревна культура, що активно вирощується у багатьох країнах світу як джерело відновлюваної енергії, та останні декілька років почала активно культивуватися в Україні. Через простоту у догляді,

швидкий ріст та енергетичний потенціал сьогодні є запит на великі партії якісних стандартизованих саджанців. Оскільки мікроклонований садивний матеріал як ожини, так і павловнії на сьогодні користується широким комерційним інтересом, вони були обрані у ролі модельних рослин для удосконалення біотехнології мікроклонування з використанням захисних мікроорганізмів.

У результаті проведеної роботи вперше для дослідних видів рослин запропоновано використання фунгіцидів під час поверхневої стерилізації експлантів, що дозволило зберігати нижчий рівень контамінації (16,7% для павловнії та 8,3% для ожини) та вищий відсоток приживлюваності (58,3% для павловнії та 73,3% для ожини) у порівнянні з контролем. Встановлено оптимальну концентрацію аскорбінової кислоти у складі середовища на етапі введення в культуру (50 мг/л – для павловнії, 100 мг/л – для ожини) та визначено, що напіврідке агаризоване середовище із 0,4% агару краще впливало на показники росту та розвитку експлантів рослин на первинних етапах мікроклонування, ніж більш щільне середовище із 0,8% агару.

Вперше досліджено використання альтернативних желюючих компонентів на різних етапах мікроклонування ожини і павловнії та встановлено, що кукурудзяний крохмаль (7%) є рекомендованим для використання на всіх стадіях мікроклонального розмноження рослин обох дослідних видів, окрім укорінення ожини. Гуарова камедь (3%) може бути використана лише на етапі укорінення мікроклонів павловнії, оскільки за її використання на інших етапах спостерігали менший рівень приживлюваності, проліферації бруньок, кількості сформованих пагонів та вузлів у рослин *in vitro*.

Оптимізовано фітогормональний склад середовища на етапі стерильного живцювання для отримання найбільшої кількості сформованих пагонів та вузлів на живцях за один цикл культивування (для павловнії – 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК, для ожини – 1,5 мг/л БАП+0,5 мг/л НОК).

Визначено антагоністичну активність бактерій *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547 та 23 ізолятів актинобактерій щодо тест-штамів фітопатогенних грибів.

Встановлено, що бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547 та дослідні ізоляти актинобактерій показали позитивний вплив на проростання насіння та ріст рослин *in vitro* на прикладі модельної рослини *Lepidium sativum* L., що забезпечувало підвищення частки пророслого насіння, збільшення довжини коренів, пагонів, і кількості коренів у проростків у порівнянні з контролем.

Визначено вплив мікроорганізмів *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. albidoflavus* Conc11, *S. pactum* Conc4, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch на приживлюваність мікроклонів у ґрунті, висоту надземної частини, кількість вузлів та площу листа рослин дослідних видів під час адаптації до умов *ex vitro*.

Показано, що найбільшу ефективність для постасептичної адаптації мікроклонів павловнії показали бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. albidoflavus* Conc32. Для адаптації ожини – *B. velezensis* ONU553, *S. globisporus* Lim4, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch. Ці бактерії можуть слугувати основою для подальшого створення консорціуму рістстимулювальних та захисних мікроорганізмів та розробки біопрепаратів, спрямованих на успішне подолання адаптаційного стресу при переході рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro*.

Для моноінокуляції в біотехнології клонування рослин під час постасептичної адаптації рекомендовано використовувати бактерії штаму *B. megaterium* ONU500 для павловнії, і бактерії штаму *B. velezensis* ONU553 – для ожини.

Складено удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу павловнії та ожини шляхом мікроклонального розмноження з використанням мікроорганізмів на етапі постасептичної адаптації мікроклонів. Рекомендовано подальші поглиблені дослідження з метою встановлення механізмів взаємодії досліджуваних бактерій та мікроклонованих рослин.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, *in vitro*, живильні середовища, фітопатогенні гриби, приживлюваність, адаптація, експлант, регулятори росту, антагоністична активність, *Bacillus*, *Enterococcus*, актинобактерії, морські мікроорганізми, захист рослин, рістстимулювальні бактерії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових наукових виданнях України

1. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2023). Вплив актинобактерій на адаптацію до умов *ex vitro* та ріст мікроклонованих рослин *Rubus fruticosus* L. Мікробіологія і біотехнологія, 1(57), 18-41, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1\(57\).276078](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1(57).276078) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
2. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2020). Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин. Мікробіологія і біотехнологія, 3, 6-31, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).214202](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).214202) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
3. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020). Удосконалення процесів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі. Мікробіологія і біотехнологія, 2, 72-84, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2\(49\).209806](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2(49).209806) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

Статті в зарубіжних виданнях

4. Tytarenko, N., Tesliuk, N., Merlich, A., Haertlé, T., & Ivanytsia, V. (2023). Impact of *Enterococcus italicus* ONU547 on the growth and acclimatization of micropropagated *Rubus fruticosus* L. and *Paulownia tomentosa* Steud. plants to

ex vitro conditions. BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 104(3), 301-313, DOI: <http://doi.org/10.5114/bta.2023.130732> (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

5. Tytarenko, N., Tesliuk, N., & Ivanytsia, V. (2023). Optimization of the protocol for the *in vitro* establishment of *Paulownia tomentosa* Steud. South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, 14(1), 1-13 (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

Матеріали та тези доповідей конференцій, з'їздів

6. Tytarenko, N., Stohnienko, O., & Tesliuk, N. (2023). Impact of actinobacteria on the growth and acclimatization of micropropagated *Paulownia tomentosa* Steud. plants to *ex vitro* conditions. In Materials of Young Scientists International Conference. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
7. Zhylovska, K.Y., Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Determination of the influence of actinobacteria on seed germination and morphometric parameters of maize sprouts. In Materials of Young Scientists International Conference, 111-115. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University (особистий внесок здобувача – аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
8. Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Modification of nutrient medium composition for *in vitro* culture establishment of *Paulownia tomentosa*. In Conference Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology, June 15-17, 2022, Kyiv, Ukraine, 45. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

9. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2021). Використання препаратів фунгіцидної дії для запобігання контамінації під час введення рослин в культуру *in vitro*. Міжнародний науковий журнал «Грааль науки», 7, 131-133 (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
10. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020). Використання аскорбінової кислоти для процесу введення рослин в культуру *in vitro*. У Гуманітарні та природничі науки: актуальні питання: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 23-24 жовтня 2020, 40-44. Херсон: Видавництво «Молодий вчений» (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
11. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018). Використання штамів *Bacillus megaterium* та *Enterococcus italicus* для мікроклонального розмноження рослин. У Теорія і практика актуальних наукових досліджень: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Одеса, 28-29 квітня 2018, 39-41. Херсон: Видавництво «Молодий вчений» (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
12. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018). Адаптація мікроклонів ожини (*Rubus caesius*) до умов *in vivo* з використанням культур мікроорганізмів. У Актуальні питання сучасної науки: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, част. II, м. Київ, 29-30 квітня 2018, 63-65. Київ: МЦНД (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
13. Титаренко, Н. В. (2017). Оптимізація клонального мікророзмноження ожини в культурі *in vitro*. У Інноваційні технології та інтенсифікація національного виробництва: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції,

частина 1, Тернопіль, 187-189. Тернопіль: Крок (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту*).

Патенти

14. Іваниця, В. О., Штеніков, М. Д., Остапчук, А. М., Горшкова, О. Г., Теслюк, Н. І., Титаренко, Н. В., & Гудзенко, Т. В. (2023). Пат. на винахід 126710 України МПК А01N63/22. Штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з рістстимулювальною активністю. Київ: Національний орган інтелектуальної власності - державна організація “Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій”. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1718149/> (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів за встановлення впливу B. velezensis ONU553 на адаптацію мікроклонованих рослин, аналіз даних, підготовка частини тексту*).

SUMMARY

Tytarenko N. V. Improvement of clonal micropropagation biotechnology of *Rubus fruticosus* L. and *Paulownia tomentosa* Steud. using microorganisms. – Manuscript.

The PhD thesis in specialty 162 «Biotechnology and bioengineering». – Odesa I.I. Mechnikov National University, Odesa, 2023.

In the dissertation, results of the improvement of clonal micropropagation biotechnology of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. and *Rubus fruticosus* L. var. Thornfree using microorganisms at the post-aseptic acclimatization stage are presented. For the studied plant species, improved technological schemes for obtaining planting material, from the stage of *in vitro* culture establishment to the stage of obtaining acclimatized seedlings in closed ground, were proposed.

Clonal micropropagation is the aseptic cultivation of plants *in vitro* for rapid reproduction, which allows obtaining a large number of genetically homogeneous

seedlings with specific characteristics. To increase the effectiveness of this method, it is necessary to consider the physiological features of certain plant species and improve standard approaches at various stages of propagation, including post-aseptic acclimatization of microclones as a stage with large potential losses of plant material.

Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) is a fruit and berry crop that is becoming increasingly widespread in Ukrainian horticulture. Thornless varieties are the most convenient for both care and harvest. Micropropagation allows for the continuous production of a large number of blackberry seedlings, even under conditions of small production capacities. Paulownia (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) is a tree crop that is actively grown in many countries as a source of renewable energy, and in recent years, it has been actively cultivated in Ukraine. Owing to their ease of care, rapid growth, and energy potential, there is a demand for large batches of standardized seedlings. Given the current high commercial demand for micropropagated planting materials of both blackberry and paulownia, they were selected as model plants for enhancing micropropagation using beneficial microorganisms.

As a result, for the first time, the use of fungicides during the surface sterilization of explants was proposed for the studied plant species, which made it possible to maintain a lower level of contamination (16.7% for paulownia and 8.3% for blackberry) and a higher survival rate (58.3% for paulownia and 73.3% for blackberry) than the control. The optimal concentration of ascorbic acid in the medium at the *in vitro* culture establishment stage was established (50 mg/l - for paulownia and 100 mg/l - for blackberry), and it was determined that a semi-liquid agar medium with 0.4% agar had a better effect on the growth and development of plant explants in the primary stages of micropropagation than solid 0.8% agar medium.

For the first time, the use of alternative gelling components at different stages of micropropagation of blackberry and paulownia was investigated, and it was established that corn starch (7%) could be recommended for use at all stages of clonal micropropagation of plants of both studied species, except for blackberry rooting. Guar gum (3%) could be used only at the rooting stage of paulownia microclones because when used at other stages, a lower survival rate, bud proliferation, and number of

formed shoots and nodes in plants were observed. The phytohormonal composition of the medium at the propagation stage was optimized to obtain the largest number of formed shoots and nodes on the cuttings in one cycle of cultivation (for paulownia - 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA, for blackberry - 1.5 mg/ l BAP+0.5 mg/l NAA).

The antagonistic activities of *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, and 23 isolates of actinobacteria against the test strains of phytopathogenic fungi were determined. It was established that the bacteria *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, and the studied isolates of actinobacteria showed a positive effect on seed germination and plant growth *in vitro* using the model plant *Lepidium sativum* L., which provided an increase in the number of germinated seeds, in the length of roots, shoots, and the number of roots in seedlings compared to the control.

The influence of *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. albidoflavus* Conc11, *S. pactum* Conc4, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, and *S. ambofaciens* Myt7ch on the survival rate of microclones in the soil, shoot length, number of nodes, and leaf area of plants during acclimatization to *ex vitro* conditions was determined.

The bacteria *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch, and *S. albidoflavus* Conc32 showed the greatest effectiveness for the post-aseptic acclimatization of paulownia microclones. For blackberry acclimatization, the most effective were *B. velezensis* ONU553, *S. globisporus* Lim4, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. albidoflavus* Conc32, and *S. ambofaciens* Myt7ch. These bacteria could potentially become the basis for further creation of a growth-promoting and protective microorganism consortium and for the development of biological preparations aimed at successfully overcoming acclimatization stress during the transfer of plants from *in vitro* to *ex vitro* conditions.

For monoinoculation in clonal micropropagation biotechnology during post-aseptic acclimatization, it was recommended to use bacteria of the strain *B. megaterium* ONU500 for paulownia and bacteria of the strain *B. velezensis* ONU553 for blackberry.

Improved biotechnological schemes for obtaining the planting material of paulownia and blackberry by clonal micropropagation using microorganisms at the post-aseptic acclimatization stage of microclones were developed. Further in-depth research was recommended to establish the mechanisms of interactions between the studied bacteria and micropropagated plants.

Key words: *clonal micropropagation, in vitro, nutrient medium, phytopathogenic fungi, survival rate, acclimatization, explant, growth regulators, antagonistic activity, Bacillus, Enterococcus, actinobacteria, marine microorganisms, plant protection, plant growth promoting bacteria.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Біотехнологія мікроклонального розмноження рослин: основні принципи та проблеми.....	26
1.2. Особливості розмноження павловнії та ожини в культурі <i>in vitro</i>	37
1.3. Використання мікроорганізмів у біотехнології рослин	43
1.4. Перспективи застосування бактерій <i>Bacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Actinobacteria</i> spp. для удосконалення біотехнології мікроклонування рослин.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	57
2.1. Місце та загальна схема досліджень.....	57
2.2. Дослідні рослини	60
2.3. Використані мікроорганізми та умови їх культивування.....	60
2.4. Використані живильні середовища та хімічні препарати.....	62
2.5. Удосконалення мікроклонального розмноження рослин на первинних етапах	64
2.5.1. Введення експлантів павловнії та ожини в культуру <i>in vitro</i>	64
2.5.2. Проведення стерильного живцювання та укорінення мікроклонів дослідних рослин	67
2.6. Визначення антагоністичних властивостей дослідних штамів бактерій до міцеліальних грибів	69
2.7. Дослідження впливу бактерій на ріст модельних рослин крес-салату <i>in vitro</i>	70
2.8. Адаптація мікроклонованих рослин павловнії та ожини до умов <i>ex vitro</i> з використанням відібраних мікроорганізмів.....	71
2.9. Порівняння впливу різних бактерій на адаптацію мікроклонів дослідних рослин за критерієм ефективності	73
2.10. Статистична обробка результатів.....	74

РОЗДІЛ 3. УДОСКОНАЛЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ПАВЛОВНІЇ ТА ОЖИНИ НА ПЕРВИННИХ ЕТАПАХ.....	75
3.1. Використання фунгіцидних препаратів на етапі введення ініціальних експлантів павловнії та ожини в культуру <i>in vitro</i>	75
3.2. Застосування аскорбінової кислоти під час введення рослинних експлантів павловнії та ожини в культуру <i>in vitro</i>	78
3.3. Вплив консистенції живильного середовища на розвиток експлантів дослідних рослин під час введення в культуру <i>in vitro</i>	82
3.4. Застосування альтернативних желюючих компонентів на етапі введення павловнії та ожини в культуру <i>in vitro</i>	85
3.5. Оптимізація фітогормонального складу живильного середовища на етапі стерильного живцювання дослідних рослин	88
3.6. Використання різних желюючих компонентів на етапах стерильного живцювання та укорінення дослідних рослин.....	92
РОЗДІЛ 4. ВІДБІР АНТАГОНІСТИЧНИХ БАКТЕРІЙ З РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ.....	97
4.1. Визначення антагоністичних властивостей дослідних бактерій до міцеліальних грибів	97
4.2. Вплив дослідних бактерій на ріст модельних рослин крес-салату	105
РОЗДІЛ 5. АДАПТАЦІЯ МІКРОКЛОНОВАНИХ РОСЛИН ДО УМОВ <i>EX VITRO</i> З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРООРГАНІЗМІВ	119
5.1. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з бактеріями <i>E. italicus</i> ONU547	119
5.2. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з бактеріями роду <i>Bacillus</i>	126
5.3. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з ізолятами актинобактерій ...	136
5.4. Порівняльний аналіз та визначення найефективніших дослідних бактерій для покращення адаптації мікроклонованих рослин	147
5.4.1. Порівняння впливу дослідних бактерій на процеси адаптації мікроклонів павловнії до умов <i>ex vitro</i>	147

5.4.2. Порівняння впливу дослідних бактерій на процеси адаптації мікроклонів ожини до умов <i>ex vitro</i>	150
РОЗДІЛ 6. РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ПРАКТИЧНОМУ ЗАСТОСУВАННЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	155
6.1 Удосконалена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження павловнії	156
6.2. Удосконалена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження ожини	161
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	166
ВИСНОВКИ	173
ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	175
ДОДАТКИ	207

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АЦК-деаміназа – 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат деаміназа;

БАП – 6-бензиламінопурин;

ГК – гуарова камедь;

ІМК – індоліл-масляна кислота;

ІОК – індоліл-оцтова кислота;

ІСР – індукована система резистентності;

КГА – картопляно-глюкозний агар;

КК – кукурудзяний крохмаль;

МС – живильне середовище Мурасіге та Скуга;

НОК – нафтилоцтова кислота;

НСР – набута система резистентності;

УКМ – Українська колекція мікроорганізмів;

DMRT – багатодіапазонний тест Дункана (від англ. «Duncan's Multiple Range test»);

PGPB – група бактерій, що стимулюють ріст рослин (від англ. «plant growth promoting bacteria»);

in vitro – культивування в асептичних умовах на живильних середовищах (від лат. «у склі»);

ex vitro – вирощування мікроклонованих рослин у ґрунті під час переходу з асептичних умов до культивування в умовах нестерильного оточуючого середовища (від лат. «поза склом»).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Мікроклональне розмноження – швидкий та зручний метод репродукції рослин, що дозволяє отримувати велику кількість садивного матеріалу за короткий час. Розмножуючи рослини цим способом, можливо оздоровити саджанці від вірусних та бактеріальних інфекцій та, за потреби, налагодити цілорічне виробництво необхідного рослинного матеріалу. Мікроклони займають небагато місця, і тому не вимагають значної площі для вирощування, як звичайні рослини. Крім того, таким способом можна розмножувати представників тих видів та сортів, які мають труднощі з традиційними методами розмноження.

Існують розроблені стандартні методи та підходи до біотехнології мікроклонування рослин. Але для різних видів рослин необхідні різноманітні прийоми та значні коригування етапів стандартних методів мікроклонування. Найбільш суттєвим моментом, що визначає ефективність мікроклонування, є отримання якісного садивного матеріалу з високим рівнем приживлюваності під час адаптації з *in vitro* до умов оточуючого середовища (Shekhawat et al. 2021).

Для отримання якісних саджанців важливими елементами оптимізації біотехнології мікроклонування рослин конкретного виду є також створення ефективних протоколів поверхневої стерилізації рослинного матеріалу, зниження рівня оксидативного стресу експлантів, підбору оптимального співвідношення і концентрації фітогормонів та інших компонентів живильного середовища на усіх етапах культивування *in vitro*.

Рівень приживлюваності *ex vitro* залежить від адаптації практично стерильної рослини до фізико-хімічних умов навколишнього середовища та мікроорганізмів (часто агресивних та не сприятливих), які починають заселяти та формувати постійну мікробіоту ризосфери рослини.

У природі рослини тісно взаємодіють із мікроорганізмами, але через культивування в асептичних умовах мікроклони не мають власної повноцінно сформованої мікробіоти, що могла б допомогти таким рослинам у більш ефективному пристосуванні до умов *ex vitro*. Тому головною ідеєю

удосконалення біотехнології клонування рослин було здійснити штучну інокуляцію мікроклонованих рослин потенційно корисними мікроорганізмами на початку їх адаптації, що забезпечить формування постійної мікробіоти ризосфери рослин, підвищить їх стійкість до враження фітопатогенами, приживлюваність мікроклонів та зовнішні характеристики. На сьогодні цій темі приділено незаслужено мало уваги та присвячено обмежену кількість досліджень (Orlikowska et al. 2016).

У ролі потенційно корисних мікроорганізмів можуть виступати бактерії, що володіють захисними властивостями проти фітопатогенів та є стимуляторами росту рослин – так звана група PGPB (від англ. – plant growth-promoting bacteria). Зазвичай, їх виділяють із самих рослин або з ґрунту, але в останні роки збільшився інтерес до мікроорганізмів, виділених із екстремальних біотопів або незвичних середовищ, оскільки дані бактерії можуть володіти специфічними механізмами адаптації до умов існування, що виявляється у продукуванні унікальних біологічних речовин (Li et al. 2021).

Бактерії групи PGPB сьогодні вже широко використовуються як агенти біоконтролю фітопатогенів та стимулятори росту цінних рослин. До PGPB належать багато таксономічних груп мікроорганізмів і, зокрема, бактерії роду *Bacillus*, молочнокислі бактерії та актинобактерії. Вони володіють великим спектром механізмів впливу на рослини. Для молочнокислих бактерій, у числі яких також знаходяться досліджувані у даній роботі ентерококи, відома здатність до синтезу фітогормонів (Lee et al. 2015) та бактеріоцинів із широким спектром дії (Okkers et al. 1999; H-Kittikun et al. 2015; Almeida-Santos et al. 2021), біосурфактантів, летких сполук та інших речовин, що впливають на фітопатогенну мікробіоту, яка робить їх потенційними компонентами біопестицидів та біодобрив (Kumar et al. 2016; David & Onifade 2018; Maany et al. 2019; Chaurasia et al. 2021; Diaz et al. 2021). Для бактерій роду *Bacillus* є характерним синтез бактеріоцинів, антибіотичних речовин, фітогормонів, полікетидів, летких сполук, гідролітичних ферментів, сидерофорів, а також

солюбілізація фосфатів та індукція біохімічних реакцій захисту у рослин (Blake et al. 2021; Carmen Orozco-Mosqueda et al. 2021; Agake et al. 2022).

Переліченими механізмами впливу володіють також і актинобактерії, що відкриває широкий потенціал їх використання для покращення росту культурних рослин та їх захисту від інфекцій (Liu et al. 2012; Palaniyandi et al. 2013; Saravanakumar et al. 2018; Kaewkla et al. 2021; Manigundan et al. 2022).

Варто відзначити, якщо використання мікроорганізмів перелічених таксономічних груп (а, особливо, бацил та актинобактерій) у аграрному секторі є добре відомим та дослідженим підходом, то встановлення їх ролі у біотехнологічному процесі мікроклонального розмноження рослин все ще залишається недостатньо вивченим. Тому пошук потенційно корисних бактерій для мікроклонованих рослин є актуальним напрямом досліджень, спрямованим на підтримку екологічності та підвищення ефективності процесу мікроклонування.

Як модельні рослини для удосконалення біотехнології розмноження в дослідженнях використали Ожину звичайну та Павловнію повстяну. Мікроклоновані саджанці зазначених видів рослин на сьогоднішній день в Україні користуються широким комерційним попитом, про що свідчить їх постійна наявність у торговому асортименті приватних біотехнологічних фірм.

Павловнія повстяна (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. – надалі «павловнія») – деревна рослина, що є популярною енергетичною культурою у багатьох країнах, та в останні роки почала активно культивуватися в Україні. Через простоту у вирощуванні та енергетичний потенціал сьогодні є попит на великі партії саджанців павловнії. Біомаса павловнії є вигідним та зручним джерелом виробництва біоетанолу, а відходи такого виробництва можуть ефективно використовуватися для виготовлення паливних брикетів, енергетична цінність при спаленні двох кілограмів яких еквівалентна одному літру дизельного палива (Ліннік 2020). Додатковою перевагою є швидкість росту цієї рослини – в оптимальних умовах стовбур дерева досягає до 40 см у поперек за 5 років (Abou El-ghait et al. 2022).

Незважаючи на обмеження в Україні на висаджування павловнії з метою відтворення лісів, контрольоване розмноження на спеціально відведених сільськогосподарських ділянках залишається актуальним. При цьому розмноження класичними вегетативними чи генеративними методами є недостатньо ефективним та не гарантує отримання здорових рослин, і саме тому є потреба в удосконаленні біотехнології розмноження павловнії для отримання генетично однорідного стандартизованого садивного матеріалу.

Ожина звичайна (*Rubus fruticosus* L. – надалі «ожина») – плодово-ягідна традиційна культура, що поступово стає все більш розповсюдженою на території України. Насадження ожини запобігають ерозії ґрунтів, а плоди використовуються у різноманітних сферах виробництва: харчовій, косметичній промисловості, а також у медицині деяких країн (Fathy et al. 2018). Популярними сьогодні є безшипні сорти, що мають відмінну якість плодів та зручні для збору врожаю. Незважаючи на те, що традиційно ожину розмножують вегетативно, успішне застосування такого способу розмноження обмежено потребою великих площ для саджанців, додаткових зусиль для боротьби з інфекційними хворобами рослин та бур'янами (Baghdady 2021). Завдяки мікроклонуванню зазначені труднощі можуть бути легко подолані, що дозволяє цілорічно отримувати великі партії саджанців у межах невеликої лабораторії (Shen et al. 1990).

Для обох вищезазначених видів рослин метод мікроклонального розмноження є не тільки зручним, але і економічно вигідним шляхом репродукції. Проте, є необхідність підвищити ефективність цього процесу за рахунок удосконалення певних етапів мікроклонального розмноження. У першу чергу, це саме стадія адаптації до умов *ex vitro*, тому що на даному етапі зазвичай гине велика кількість садивного матеріалу. Це відбувається через високу сприйнятливість мікроклонів до інфекцій та деякі фізіологічні особливості (недорозвинена кутикула, надмірна інтенсивність транспірації, недостатній рівень фотосинтезу і т.д.) та загальну недостатню стресостійкість порівняно до звичайних рослин (Shekhawat et al. 2021). Під час асептичного культивування рослини розвиваються в особливих умовах, що неможливо відтворити поза

межами культуральної ємності, тому звичайне відкрите середовище є для них джерелом стресу (Talla et al. 2022). Постасептична адаптація, як одна з найменш універсальних стадій мікроклонального розмноження, потребує розробки нових підходів для зменшення адаптаційного стресу мікроклонів.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було удосконалити біотехнологію мікроклонального розмноження та постасептичної адаптації мікроклонів павловнії *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів.

Для досягнення мети вирішувались наступні задачі:

1. Розробити ефективні прийоми поверхневої стерилізації ініціальних експлантів павловнії та ожини.
2. Удосконалити процеси введення в культуру *in vitro* експлантів павловнії та ожини.
3. Оптимізувати процес стерильного живцювання та укорінення *in vitro* павловнії та ожини.
4. Здійснити відбір бактерій – потенційних захисних агентів для мікроклонованих рослин шляхом визначення антагоністичної активності до фітопатогенних грибів.
5. Здійснити відбір бактерій – потенційних стимуляторів росту рослин через визначення впливу на проростання насіння та ріст проростків модельної рослини крес-салату.
6. Удосконалити процеси *ex vitro* адаптації мікроклонів павловнії та ожини з використанням відібраних мікроорганізмів.
7. Визначити найбільш ефективні бактерії для покращення адаптації мікроклонів дослідних рослин за допомогою порівняння за критерієм ефективності.
8. Створити удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу павловнії та ожини шляхом мікроклонального розмноження.

Об'єкт дослідження – процес мікроклонального розмноження та постасептичної адаптації дослідних рослин.

Предмет дослідження – створення нових прийомів для удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження павловнії та ожини з використанням мікроорганізмів на етапі *ex vitro* адаптації.

У роботі використані загальноприйняті методи дослідження: біотехнологічні – метод мікроклонального розмноження рослин шляхом активації бруньок та наступного живцювання *in vitro*, мікробіологічні – визначення антагоністичної активності методом агарових блоків, бактеріальна інокуляція рослин, агробіологічні – визначення показників росту та розвитку рослин, організаційні – порівняльний аналіз, статистичні – метод дисперсійного аналізу, багатодіапазонний тест Дункана.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Виконання дисертаційної роботи проводилося в межах держбюджетних науково-дослідних тем Біотехнологічного науково-навчального центру (БННЦ) та кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: «Вивчення біологічної різноманітності, молекулярно-біологічних та біотехнологічних характеристик ендofітних бактерій та їх взаємодії з рослинами» (державний реєстраційний номер: 0117U001109), «Біологічна різноманітність актинобактерій Чорного моря, їх біотехнологічний потенціал та пошук продуцентів нових антимікробних сполук» (державний реєстраційний номер: 0120102177), «Пошук продуцентів нових антимікробних сполук проти мультирезистентних патогенних мікроорганізмів серед мікробіоти Чорного моря» (державний реєстраційний номер: 01180000201).

Наукова новизна отриманих результатів. Теоретично обґрунтовано та відпрацьовано удосконалені процеси мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів на стадії постасептичної адаптації рослин та протоколи біотехнологічного процесу мікроклонування цих рослин.

Вперше для павловнії та ожини встановлено високу дієвість фунгіцидних речовин ципродинілу та дифеноконазолу (препаратів Хорус і Скор, відповідно) для поверхневого знезараження ініціальних експлантів як додаткового етапу стерилізації рослинного матеріалу. Для експлантів павловнії використання ципродинілу у концентрації 1,4 г/л знизило рівень контамінації на 48,3% та підвищило приживлюваність експлантів на середовищі на 45,0%, а для експлантів ожини використання дифеноконазолу у концентрації 1 мл/л знизило рівень контамінації на 38,4% та підвищило приживлюваність на 51,6%.

Показано позитивний вплив аскорбінової кислоти у середовищі культивування на зниження оксидативного стресу і зменшення рівня некрозу експлантів та залежність росту експлантів від концентрації агару у живильному середовищі,

Встановлено, що на етапі живцювання для отримання найбільшої кількості сформованих пагонів та вузлів на живцях за один цикл культивування найбільш ефективним є фітогормональний склад для павловнії - 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК, а для ожини найкращим є співвідношення регуляторів росту 1,5 мг/л БАП+0,5 мг/л НОК.

Показано, що антагоністично активні бактерії *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *S. albidoflavus* Conc11, *S. pactum* Conc4, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch стимулюють проростання насіння та ріст рослин крес-салату *in vitro* із підвищенням частки пророслого насіння, збільшенням довжини коренів та пагонів, а також кількості коренів у проростків у порівнянні з контролем.

Вперше встановлено, що бактерії *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch і *S. albidoflavus* Conc32 є ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів павловнії, а *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch – для адаптації ожини.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновані підходи удосконалення різних етапів мікроклонального розмноження ожини та павловнії, а, особливо, використання рістстимулювальних мікроорганізмів, можуть бути застосовані для розробки ефективних біотехнологій процесу клонування рослин інших видів з мінімальними втратами рослинного матеріалу та отриманням якісних генетично однорідних саджанців.

Рекомендовано використовувати в біотехнології клонування рослин павловнії під час постасептичної адаптації бактерії штаму *B. megaterium* ONU500, а для ожини – бактерії штаму *B. velezensis* ONU553. Бактерії, що показали позитивний вплив на постасептичну адаптацію мікроклонів, будуть слугувати основою для подальшого створення консорціуму рістстимулювальних та захисних мікроорганізмів, та будуть використані для розробки біопрепаратів, що направлені на успішне подолання адаптаційного стресу при переході рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro*.

На штам *Bacillus velezensis* ONU553 отримано патент на винахід 126710 МПК А01N63/22 «Штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпепептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю» та подано заявку на патент на винахід а202204268 «Штам *Streptomyces ambofaciens* ONU561 з антибіотичною та рістстимулювальною активностями».

Результати роботи використовуються у навчальному процесі при викладанні курсів «Біотехнологія рослин», «Загальна біотехнологія», «Мікробіологія» та спеціальному практикумі на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Особистий внесок здобувача. Особисто здобувачем виконано основний обсяг експериментальної роботи, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів: здійснено введення експлантів дослідних рослин в культуру *in vitro*, проведено модифікацію протоколів стерилізації, складу живильного середовища на різних етапах мікроклонування. Разом із доцентом, к.с.-г.н. Н.І. Теслюк

проведено визначення антагоністичної активності бактерій щодо фітопатогенів, встановлення здатності відібраних штамів бактерій до стимулювання росту рослин та адаптаційні експерименти з інокуляції мікроклонів під час постасептичної адаптації у Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ.

Планування роботи та узагальнення результатів виконано спільно із науковим керівником проф. В. О. Іваницею та доцентом, к.с.-г.н. Н.І. Теслюк.

Автор висловлює щиру подяку науковому керівнику проф. В. О. Іваниці та доценту, к.с.-г.н. Н.І. Теслюк за наукове консультування і спільно сплановану та виконану експериментальну роботу, співробітникам відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України – за надані тест-штами міцеліальних грибів для дослідження, та співробітникам БННЦ ОНУ к.б.н. Н.Ю. Васильєвій, к.б.н. Н.В. Коротаєвій, Г.В. Лісютіну, к.б.н. А.Г. Мерлічу., к.б.н. І.В. Страшновій, к.б.н. Криловій К.Д., к.б.н. М.Д. Штенікову – за надані штами та ізоляти бактерій для дослідження.

Авторство в наукових працях, опублікованих у співавторстві, складає 50-90%. У публікаціях зі співавторством внесок здобувача полягав у здійсненні експериментальних досліджень, статистичному аналізі отриманих даних, узагальненні результатів, підготовці текстів тез доповідей, презентацій та рукописів наукових статей.

Апробація матеріалів дисертації. Результати проведених досліджень доповідалися на наступних конференціях: IV Міжнародна науково-практична конференція «Інноваційні технології та інтенсифікація розвитку національного виробництва» (Тернопіль, Україна, 30 листопада, 2017), II Міжнародна науково-практична конференція «Теорія і практика актуальних наукових досліджень» (м. Одеса, Україна, 28–19 квітня, 2018), IV Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної науки» (м. Київ, Україна, 29-30 квітня, 2018), II Міжнародна науково-практична конференція «Гуманітарні та природничі науки: актуальні питання» (м. Дніпро, Україна, 23-24 жовтня, 2020),

II Міжнародна науково-практична конференція «Scientific researches and methods of their carrying out: world experience and domestic realities» (м. Вінниця, Україна, та м. Відень, Австрія, 27 серпня, 2021), 76 конференція професорсько-викладацького складу та наукових працівників ОНУ ім. І.І. Мечникова (м. Одеса, Україна, 24-25 листопада, 2021), міжнародна конференція «The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation» (м. Київ, Україна, 15-17 червня, 2022), міжнародна конференція «Modern problems of Biology, Biotechnology, and Biomedicine» в рамках XVII International Summer School «Molecular Biology, Biotechnology, and Biomedicine» (м. Одеса, Україна, 11-12 липня, 2022), міжнародна конференція «Modern problems of Biology, Biotechnology, and Biomedicine» в рамках XVIII International Summer School «Molecular Biology, Biotechnology, and Biomedicine» (м. Одеса, Україна, 29-30 червня, 2023).

Публікації. За темою дисертації було підготовлено 14 наукових публікацій, з яких 2 статті у зарубіжних журналах, що входить до наукометричної бази Scopus, 3 статті у фахових журналах категорії Б, 1 патент на винахід та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить 5 розділів, узагальнення, висновків та списку цитованої літератури, що містить 272 найменування, з них 251 англomовне. Основний зміст роботи викладено на 211 сторінках машинописного тексту. Ілюстративний матеріал подано у вигляді 59 рисунків та 14 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біотехнологія мікроклонального розмноження рослин: основні принципи та проблеми

Загальний опис технології розмноження рослин in vitro. Культура клітин та тканин рослин *in vitro* є сукупністю методів культивування рослинних клітин, тканин чи органів в асептичних контрольованих умовах на живильному середовищі певного складу. У випадку, якщо ці методи використовують для виробництва великої кількості клонів від донорної рослини, їх називають процесом мікроклонального розмноження. Дане явище базується на здатності рослин до вегетативного розмноження, а також є можливим завдяки тотіпотентності, коли цілий рослинний організм має здатність регенерувати навіть із однієї клітини (Abdalla et al. 2022).

На сьогоднішній день мікроклонування є дуже популярним та добре розвиненим напрямом як у наукових установах, так і в комерційному секторі. Цей спосіб вирізняється високим коефіцієнтом розмноження та генетичною ідентичністю між вихідною материнською рослиною і отриманими клонами. На сучасному стані розвитку методу мікроклонального розмноження особлива увага приділяється удосконаленню технології цінних видів рослин для підвищення ефективності та економічності процесу отримання садивного матеріалу (Kundu et al. 2022).

Завдяки методу мікроклонального розмноження, стало можливим швидко отримувати саджанці із заданими характеристиками у великих об'ємах протягом цілого року навіть за відсутності великих площ та вартісної апаратури, як цього потребують традиційні методики розмноження рослин. Усе це суттєво знижує собівартість рослинного матеріалу. Окрім того, метод мікроклонування виявляється практично незамінним у випадку необхідності отримання великої кількості клонів від гібридів або нещодавно створених сортів рослин, що неможливо розмножити статевим шляхом без втрати цінних ознак (Gupta & Chaturvedi 2022).

Мікроклони є дуже зручним об'єктом для різноманітних фізіологічних досліджень (Xiao et al. 2020), оскільки є однорідними та, за дотримання технології, не демонструють генетичної варіабельності. Також, беззаперечною перевагою мікроклонального розмноження є оздоровлення садивного матеріалу від вірусів та мікоплазм, що відбувається через асептичне культивування меристем (Abdalla et al. 2022).

Специфіка роботи з мікроклонами полягає в тому, що кожен вид, а іноді і сорт рослин зазвичай потребує власної розробленої біотехнології розмноження зі своїми особливостями. На сьогодні вже відомо про більше, ніж дві тисячі розроблених спеціальних технологій розмноження для квіткових рослин (Черевченко та ін. 2008), а, особливо, для господарсько-цінних видів.

Рівень комерційного виробництва садивного матеріалу, отриманого шляхом мікроклонування, поступово продовжує зростати. В Україні вже відомі такі компанії, як ТОВ «Berry Partner» (Львів), ТОВ ФАРМЕР.УА (Київ), ТОВ «ПАВЛОВНІЯ УА» (Ужгород) та інші, що займаються продажами таких саджанців у промислових масштабах.

Загалом, процес мікроклонального розмноження рослин *in vitro* поділяється на декілька основних послідовних стадій (Кунах 2005; Подгаєцький та ін. 2018; Kundu et al. 2022):

1. Введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro*. Ця стадія включає в себе відбір експлантів, їх поверхневу стерилізацію, перенос на живильне середовище та культивування у відповідних умовах до моменту утворення із меристем пагонів із розвиненими листками та бруньками.
2. Власне мікроклонування, або стерильне живцювання. На цьому етапі рослинний матеріал проходить декілька циклів вирощування, під час яких новоутворені пагони розділяються на одновузлові живці та переносяться на свіже живильне середовище для подальшого культивування. Кількість можливих циклів живцювання залежить від виду рослини.
3. Укорінення мікроклонів *in vitro*. На цій стадії живці переносять на живильне середовище для укорінення, де, власне, і відбувається коренеутворення у

рослин-регенерантів. Після досягнення достатніх розмірів і розвитку вегетативних органів, рослини стають готовими до наступного етапу, що відбувається поза межами асептичного культивування.

4. На стадіях культивування *in vitro* важливо оптимізувати процеси стерилізації рослинного матеріалу, склад живильного середовища для найшвидшого росту та розвитку новоутворених пагонів, а також умови культивування експлантів. Особливими задачами мультиплікації рослин в асептичних умовах є пришвидшення росту пагонів у довжину та індукція формування якнайбільшої кількості вузлів на одному експланті, що дозволить у майбутньому отримати більшу кількість живців (Kundu et al. 2022).
5. Адаптація мікроклонів до умов *ex vitro*. На даній стадії відбувається перенос укорінених рослин з культури *in vitro* до умов закритого ґрунту та їх звикання до нестерильних умов оточуючого середовища із іншою вологістю, складом повітря, та доступністю поживних речовин. Частіше за все адаптацію мікроклонів виконують за принципом масштабування, поступово пересаджуючи з посудин меншого об'єму до більшого. Після цього рослини можуть бути пересаджені до відкритого ґрунту (Nazarika et al. 2006).

Зазвичай, основою для комерційної реалізації стають адаптовані до умов закритого ґрунту мікроклони. Іноді деякі виробники продають укорінені мікроклони *in vitro* як садивний матеріал, що, однак, несе в собі ризики втрати великої кількості рослин на етапі адаптації до умов ґрунту, оскільки цей етап є одним із критичних у біотехнології розмноження багатьох видів. Тому, вважати неадаптований мікроклон повноцінним саджанцем не є можливим, а стадія адаптації потребує додаткової уваги як у наукових дослідженнях, так і в комерційних лабораторіях при вирощуванні садивного матеріалу шляхом мікроклонального розмноження.

Сучасні проблеми при мікроклонуванні рослин. На кожному із вищеписаних етапів мікроклонального розмноження рослин можуть виникати проблеми, пов'язані із широким спектром можливих причин: біологічних, фізіологічних, генетичних або технічних (Park 2021).

На етапі введення у культуру *in vitro* важливо отримати вільні від інфекції експланти, що стабільно ростуть на живильному середовищі і придатні для наступних пасажів. Для успішної реалізації даної мети необхідно враховувати наступні фактори:

- 1) правильний вибір рослини-донора та виділення експланта;
- 2) оптимальна пора року для введення;
- 3) підбір ефективної схеми стерилізації рослинного матеріалу;
- 4) відповідні умови для культивування (Gupta & Preeti 2022).

На стадії введення рослин в культуру *in vitro* поширеною є проблема контамінації її мікроорганізмами. Інфікування може бути як бактеріальним, так і грибовим, і часто слугує основним обмежуючим фактором для ефективного розмноження деяких рослин, суттєво підвищуючи ціну отриманого садивного матеріалу (Gangopadhyay et al. 2017). Джерелом контамінації може бути недостатньо простерилізований лабораторний посуд або інструмент, живильне середовище чи поверхня самих експлантів, або ендofітні мікроорганізми з материнської рослини. Для запобігання даній проблемі використовують різноманітні методи поверхневої стерилізації, що включають використання хімічних агентів, ультрафіолетового опромінення, додаткового автоклавування та прожарювання робочих матеріалів (Seliem et al. 2020). Іноді, у разі високого рівня ендofітного інфікування, до середовища вводять антибіотичні речовини, але використання антибіотиків є небажаним з огляду на глобальні проблеми резистентності (Jugreet & Mahomoodally 2020).

Для поверхневої стерилізації ініціальних експлантів використовують протоколи, що складаються із декількох кроків (Титаренко & Теслюк 2021).

Зазвичай, ефективним є промивання експлантів водопровідною водою із детергентами, а потім – обробка хімічними агентами (як гіпохлорит натрію чи етанол у різних концентраціях) (Singh 2018). Також можуть додавати фунгіциди з метою додаткової обробки або як компонент живильного середовища – наприклад, беноміл (Ahmadpoor et al. 2022).

Іноді, навіть за умов відсутності видимої контамінації, експланти часто гинуть протягом перших тижнів культивування. Це відбувається через виділення у середовище фенолоподібних речовин пошкодженими частинами експланта та подальше їх окиснення. Продукти цього окиснення можуть зв'язуватися із білками рослинних клітин і деякими ферментами, викликати порушення клітинного метаболізму, інгібувати ріст рослин та, врешті, призводити до смерті експлантів (Zhao et al. 2021). Зовнішньо це проявляється як побуріння самого експланта та живильного середовища навколо нього.

Феноли – одні з найрозповсюдженіших вторинних метаболітів рослин. На сьогодні відомо більше 8000 фенольних сполук. При пошкодженні рослинних покривів, феноли окиснюються на світлі за участі ферменту поліфенолоксидази (ПФО), а також деяких інших з групи оксидаз. Продукти цього окиснення є токсичними інгібіторами клітинного росту, які пригнічують активність життєво важливих ензимів. Особливо багаті на фенолоподібні сполуки деревні види рослин (Ishtiaq et al. 2013).

Оскільки при підготовці експланта до введення у культуру дослідник у абсолютній більшості випадків вимушений пошкодити тканини рослини, фенольне окиснення стає серйозною перепоною для введення рослин у культуру *in vitro*. Для подолання цієї проблеми сьогодні використовують різні прийоми: попередня обробка експлантів антиоксидантами, включення антиоксидантів та сорбентів у середовище, інкубація у темряві, часті пересадки на свіже середовище, культивування у рідкому середовищі і т. д. (Teixeira da Silva et al. 2019). Ефект від цих маніпуляцій може бути різним у залежності від виду рослин та типу експланта.

Одним з найпростіших та економічно вигідних методів пом'якшення оксидативного стресу є використання аскорбінової кислоти у ролі антиоксиданта. Ця сполука не взаємодіє з ПФО, але зменшує кількість субстрату для окиснення, що дозволяє зменшити рівень побуріння середовища та попередити гибель мікроклонів. Аскорбінову кислоту у різних концентраціях використовують як для замочування експлантів перед введенням у культуру, так і шляхом додавання безпосередньо у середовище. Наприклад, замочування експлантів Стретліції королівської *Strelitzia reginae* у розчині аскорбінової та лимонної кислот протягом 12 годин незначно зменшувало окиснення фенолів у середовищі, а витримка протягом 24 годин майже повністю позбавила цієї проблеми (Ziv & Halevy 1983). У іншому дослідженні спостерігався значний позитивний вплив після витримки експлантів протягом години у суміші 100 мг/л аскорбінової та 1500 мг/л лимонної кислот (Wu & du Toit 2004).

Але частіше аскорбінова кислота використовується для додавання у живильне середовище. У багатьох експериментах на різних рослинах ця стратегія показала свою ефективність. Проте, на теперішній час існує велика різноманітність та неоднорідність результатів досліджень, оскільки ефективні концентрації доданої аскорбінової кислоти дуже сильно відрізняються. Наприклад, у дослідженні, що проводили Оразбаєва та ін. (2012) на рослинах малини, ефективною для покращення росту та зменшення оксидативного стресу виявилась мінімальна концентрація 1 мг/л. Irshad et al. (2018) визначили найбільш ефективною концентрацію 15 мг/л на експлантах бамії, а Ndakidemi et al. (2014) показали найбільший позитивний вплив концентрації 100 мг/л при введенні в культуру експлантів рослин банану. Результати цих досліджень свідчать про важливість експериментального підбору концентрацій аскорбінової кислоти в живильному середовищі для різних видів рослин (Титаренко & Теслюк 2020a).

На етапі стерильного живцювання, або власне мікроклонування також можуть виникати певні складнощі. Наприклад, в деяких випадках може виникнути явище соматоклональної варіабельності – спонтанної появи генетичних

аномалій, що проявляються фенотипово та наслідуються наступними поколіннями мікроклонованих рослин. Це може стати суттєвою перепорою для розмноження, оскільки його метою є отримання генетично ідентичних мікроклонів (Pawełkowicz et al. 2021). Вірогідність появи соматоклональної варіабельності залежить від генотипу: існують види, що в умовах асептичного культивування схильні до цього більше, ніж інші (Asquith 2012). Проте, можна мінімізувати появу цього небажаного ефекту шляхом створення належних умов культивування: частіший перенос на свіже середовище, мінімально необхідне використання фітогормонів, налагодження оптимальних умов вирощування у культуральній кімнаті, додержання рекомендованої кількості циклів культивування для певних видів рослин (Solano et al. 2019).

Інша можлива перепорою під час мікроклонального розмноження – гіпергідратованість тканин, що є фізіологічним порушенням розвитку рослин *in vitro*. У цьому випадку рослини формують напівпрозорі вітрифіковані пагони та листи, що мають більш світлий колір порівняно до нормальних рослин, та через надмірне обводнення тканин дуже легко ламаються. Зазвичай, подібні зміни є необоротними, а тому гіпергідратовані рослини не підлягають подальшому пасажуванню (Isah 2019). Основними причинами цього є висока вологість, недостатнє освітлення, занадто висока концентрація солей у середовищі, акумуляція етилену у посудинах для вирощування рослин, консистенція середовища, тип експланта і т.д. Як і у попередньому випадку, на дане явище можливо впливати шляхом контролю умов культивування та складу середовища, але різні рослини можуть потребувати різних підходів у вирішенні цієї проблеми (Gao et al. 2020).

Окрім того, вірогідне виникнення також інших складностей під час мікроклонального розмноження, як етіоляція пагонів мікроклонів, спонтанний некроз, нечутливість до регуляторів росту, труднощі із укоріненням і т.д. (Abdalla et al. 2022). Вони зазвичай виникають за неналежних умов культивування, технічних помилок лаборантів, неоптимального складу живильного середовища, або через генетичні особливості представників деяких

видів. Подолання цих проблем у більшості випадків є можливим та відбувається за рахунок оптимізації біотехнологічних схем мікроклонального розмноження для певних рослин.

Варто відзначити, що однією з найбільших перепон для ефективного розмноження рослин *in vitro* є стадія адаптації мікроклонів до умов *ex vitro*. Під час асептичного культивування рослини знаходяться в умовах постійної високої вологості, температури, освітлення, безперервного надходження поживних речовин із середовища, сталих концентрацій фітогормонів. У такій замкненій системі рослини позбавлені контактів зі звичайним повітрям та мікроорганізмами у ньому, тому перенос мікроклонів у відкрите середовище є джерелом стресу (Talla et al. 2022).

Особливості фізіології мікроклонів заключаються, наприклад, у менш розвиненій кутикулі на листках порівняно до звичайних рослин (Deb & Imchen 2010), меншій кількості епідермальних волосків, зниженому вмісті хлорофілу, меншій поглинаючій здатності коренів, нефункціональності продихів (Donelly & Vidaver 1984). Усі ці риси знижують життєздатність мікроклонів в умовах їх перенесення до ґрунту. Тому фізіологічні особливості, притаманні мікроклонованим рослинам в культурі *in vitro*, мають фактично перебудуватися для успішного виживання *ex vitro* (Posposilova et al. 1999).

Умови як закритого, так і відкритого ґрунту вирізняються більш інтенсивним та непостійним освітленням, сухішим повітрям, коливаннями температури, складнішим доступом до нутрієнтів, необхідністю постійного контакту із різноманітними мікроорганізмами. Саме тому велика кількість мікроклонів зазвичай гине на заключному етапі розмноження садивного матеріалу (Goncalves et al. 2017). Для максимально ефективного переходу стадія адаптації є особливо необхідною, але зазначений процес є одним з найменш уніфікованих серед усіх стадій мікроклонального розмноження та потребує розробки детальних дієвих протоколів для кожного цінного виду рослин. Зазвичай, загальною рисою для ефективної адаптації будь-яких рослин є принцип поступовості, коли контакт із оточуючим середовищем відбувається

повільно та включає декілька стадій. Саме для цього здійснюють, наприклад, передадаптацію мікроклонів, коли у посудинах для культивування (найчастіше, у кришках) роблять невеликі отвори, поступово збільшуючи їх протягом декількох діб для поступового встановлення газообміну рослин за участі звичайного повітря та повільного зниження відносної вологості (Leite et al. 2021).

В цілому, існує два основні підходи до адаптації мікроклонів, що можуть використовуватися як окремо, так і разом: біотичний та абіотичний (Gupta & Chaturvedi 2022).

Для покращення адаптації абіотичними методами на рослини намагаються здійснювати вплив шляхом зміни фізичних умов, за допомогою різноманітних хімічних речовин чи коригувань складу середовища на етапі укорінення. Наприклад, деякі дослідження показали вплив концентрації сахарози у середовищі МС на подальшу адаптацію рослин. Kumar et al. (2001) показали, що підвищення концентрації сахарози до 3% підвищувало рівень приживлюваності мікроклонів рослин мандарину у ґрунті, а Mehta et al. (2000) виявили підвищення кількості сформованих пагонів на 14% у експлантів тамаринду за підвищення концентрації сахарози із 2% до 4%. Проте, для інших видів рослин, ефективним допоміжним засобом для покращення адаптації може стати навпаки зниження або повне виключення цукрів із складу живильного середовища (Kozai 1988). Такий спосіб виявився дієвим для адаптації мікроклонів хризантеми, а його ефективність, на думку авторів дослідження, базується на активації механізмів автотрофного живлення у рослини в умовах *in vitro* (Short et al. 1987).

Інший абіотичний підхід засновано на поступовому зниженні відносної вологості, в якій перебувають мікроклони під час переходу до умов *ex vitro*. Оскільки зазвичай у культуральних ємностях під час мікроклонування рослини знаходяться в умовах високої вологості, вони не формують достатньо щільної кутикули та мають нефункціональні продихи. Саме тому деякі дослідження специфічно направлені на боротьбу із цією проблемою шляхом використання спеціальних осушувачів, силікагелю, водонепроникного шару ланоліну над середовищем, технік низового охолодження, посилення вентиляції

культуральних посудин тощо (Asayesh et al. 2017). Існують також спеціально розроблені ємності для культивування рослин із зниженою відносною вологістю, розроблені Tanaka et al. (1992), що показали свою високу ефективність для подальшої адаптації мікроклонованих рослин. Проте, використання такої розробки є високовартісним та не завжди виправданим методом полегшення адаптаційного стресу.

Окремим абіотичним підходом є використання регуляторів росту рослин чи речовин, подібних до фітогормонів. Наприклад, додавання у живильне середовище перед адаптацією паклобутразола (антагоніста гіберелінів) значно підвищувало приживлюваність у ґрунті мікроклонів цитрусових (Hazarika et al. 2000) та хризантем (Wang & Steffens 1987). Іноді для успішної адаптації використовують специфічні співвідношення ауксинів на останньому циклі мікроклонування (Soares & Miranda 2016).

Останнім часом все більш популярними стають біотичні методи покращення адаптації, що засновуються на інокуляції мікроклонованих рослин різноманітними корисними мікроорганізмами (Al-Ani 2019). У природних умовах усі рослини мають власну мікробіоту, що може існувати як на поверхні рослинних тканин, так і всередині них. Завдяки взаємодіям із мікроорганізмами, рослини здатні активувати біохімічні реакції захисту від патогенів, що називаються індукованою (або набутою) системною резистентністю (ISR та HSR), а також можуть безпосередньо отримувати користь від симбіозу шляхом полегшення доступу до деяких поживних речовин, зниженням рівня гормонів стресу та іншими способами, що детальніше описані у наступних підрозділах.

Оскільки метод мікроклонального розмноження передбачає максимальну елімінацію мікрорганізмів з експлантів для введення в культуру *in vitro*, під час адаптації рослини не мають власної сталої мікробіоти. Це є додатковим елементом стресу, оскільки під час висадки у ґрунт (навіть простерилізований), рослини мають протистояти не тільки несприятливим фізичним умовам, а і багаточисленним опортуністичним патогенам, що можуть знаходитися у повітрі та на поверхнях навколо. З метою покращення зовнішніх характеристик

садивного матеріалу та його стійкості до інфекцій є доцільною інокуляція рослин потенційно корисними мікроорганізмами на етапі адаптації. Такий підхід вже показав свою високу ефективність для деяких видів рослин та отримав назви «біопраймингу» чи «біотизації» мікроклонів (Nowak 1998). Проте, цей процес є дуже специфічним та залежить від багатьох факторів, починаючи від особливостей життєдіяльності рослини та інокулянтів, і закінчуючи умовами проведення адаптації. Тому, питання біотизації мікроклонованих рослин є перспективним та цікавим напрямом досліджень.

На сьогодні широко вивчається питання інокуляції потенційно корисними грибами. Особливо це стосується тих видів рослин, що у природних умовах формують із ними тісні симбіотичні відносини (Akin-Idowu et al. 2009). Не менш актуальними є дослідження бактерій, що позитивно впливають на ріст і розвиток мікроклонів у ґрунті – ці бактерії об'єднують у групу рістстимулювальних для рослин PGPB (від англ. plant growth-promoting bacteria). Детальний опис таких бактерій та механізмів їх впливу надано у наступному підрозділі.

В цілому, успіх мікроклонування залежить від протоколу, оптимально підбраного для ефективного розмноження обраного виду рослин. Оптимізація протоколів розмноження цінних видів та сортів є однією із основних задач комерційної біотехнології рослин (Barat & Perrotte 2021; Sriskanda et al. 2021; Bhat et al. 2022). Особлива увага при цьому приділяється стадії адаптації мікроклонів до умов ґрунту, оскільки саме вона обумовлює ефективність процесу через потенційні значні втрати рослинного матеріалу. Для покращення адаптації доцільно використовувати біотичні методи, оскільки вони підтримують принцип сталого сільського господарства та є економічно вигіднішими порівняно до абіотичних підходів.

В Україні на сьогоднішній день отримання саджанців шляхом мікроклонального розмноження стає все більш популярним. Функціонують декілька компаній, що займаються мікроклонуванням на промисловому рівні. Тому відпрацювання та оптимізація протоколів для цінних та перспективних рослин є актуальним напрямом досліджень. Одними з рослин, що зараз

користуються попитом на ринку мікроклонування України, є Павловнія повстяна та Ожина звичайна безшипних сортів. Дані види були обрані як модельні для досліджень з оптимізації біотехнології їх мікроклонального розмноження.

1.2. Особливості розмноження павловнії та ожини в культурі *in vitro*

Зазвичай, для різних видів рослин необхідні різні підходи та значні коригування стандартних методів мікроклонування. Наприклад, на стадії введення експланта в культуру *in vitro* схема стерилізації ініціальних експлантів підбирається індивідуально в залежності від виду рослини, типу експланта, потенційного інфекційного навантаження тощо. Склад середовища, а, особливо, склад та співвідношення фітогормонів, також зазвичай є специфічним показником, що визначається експериментально у ході розробки біотехнологічної схеми розмноження певних рослин як на стадії введення, так і у процесі подальшого культивування (Twaij et al. 2020).

Важливим результатом, що визначає доцільність та ефективність мікроклонування, також є якість отриманих саджанців і рівень їх приживлюваності під час адаптації з умов *in vitro* до умов оточуючого середовища. На етапі адаптації рослин до умов *ex vitro* особливо важливим є їх захист від грибкових фітопатогенів, оскільки завдяки легкому розповсюдженню спор у повітрі мікроклоновані рослини часто у першу чергу уражаються саме грибковими захворюваннями. З метою запобігання інфекції іноді мікроклони обробляються різноманітними хімічними фунгіцидами, що на даній стадії розмноження є небажаним фактором забруднення навколишнього середовища (Chinnappan 2018). Зменшення адаптаційного стресу мікроклонів є сьогодні одним з найважливіших завдань у біотехнології рослин.

Павловнія повстяна (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) – деревна культура, що стрімко набирає популярність у господарстві багатьох країн (Tytarenko et al. 2023b). Через свій активний ріст, простоту у вирощуванні, енергетичну та декоративну цінність сьогодні є попит на великі партії саджанців павловнії. Методом мікроклонального розмноження зручно отримувати велику кількість оздоровлених саджанців за короткий час (Crisan 2016).

Paulownia tomentosa є швидкоростучим деревом родини Павловнієві (*Paulowniaceae*), що налічує сьогодні більше 20 видів (Barton et al. 2007). В оптимальних умовах стовбур дерева цього виду досягає за 5 років 30-40 см у поперек (Abou El-ghait et al. 2022). Деревина павловнії є важливим джерелом відновлюваного палива та придатна для виробництва біоетанолу (з однієї тонни біомаси можна отримати до 0,5 тонни етанолу), а також паливних пелет чи брикетів (Ліннік 2020). Павловнію також висаджують як декоративну рослину через візуально привабливе рясне цвітіння та використовують як медоносну культуру та джерело деревини для виготовлення музичних інструментів, меблів, предметів побуту (Munaf et al. 2022).

Цей вид є таким, що добре адаптується та широко розповсюджується природнім шляхом, і у деяких південних країнах розглядається як інвазивна рослина (Yadav et al. 2013).

Проте, павловнія, вирощена шляхом статевого розмноження, характеризується генетичною неоднорідністю та досить високою сприйнятливістю до захворювань (Bergmann & Moon 1997). Насіння вирізняється дуже повільним проростанням, втратою схожості протягом декількох місяців та низькою швидкістю росту порівняно до розмноження живцями (Rahman et al. 2013).

Наявні цінні господарсько-екологічні риси вирощування павловнії є потенційно корисними для контрольованого вирощування цієї культури в Україні на спеціально відведених сільськогосподарських ділянках чи на територіях парків (Tytarenko et al. 2023c). Контрольоване розмноження та культивування рослин павловнії із заданими характеристиками вигідно здійснювати методом мікроклонального розмноження. Живцювання *in vitro* дозволяє цілорічно отримувати генетично однорідні оздоровлені саджанці у великих кількостях та за дуже короткий проміжок часу. Метод є також і економічно вигідним, проте існують деякі обмеження асептичного культивування даної рослини, які можуть негативно впливати на коефіцієнт розмноження. Це виявляється вже на початку біотехнологічного процесу

мікроклонального розмноження – стадії введення павловнії в культуру *in vitro* (Cobrado & Fernandez 2016, Zarei et al. 2023).

Під час первинних етапів мікроклонального розмноження необхідно враховувати багато факторів, у тому числі, вибір донорної рослини, типу експланту, пори року для відбору, умов культивування, схеми поверхневої стерилізації ініціальних експлантів (Tytarenko & Tesliuk 2022). Контамінація є однією з найбільш розповсюджених проблем при розмноженні павловнії (Magar et al. 2016). Іноді, навіть за умови успішної елімінації мікроорганізмів, експланти все одно гинуть протягом перших днів культивування через виділення фенолоподібних речовин, подальше окиснення яких призводить до побуріння середовища та експланту і блокування транспорту поживних речовин у рослинних тканинах (Ishtiaq et al. 2013).

У літературі описані можливі шляхи вирішення вищезазначених проблем. Наприклад, рівень контамінації середовища можливо зменшити шляхом змін у схемі дезінфекції донорного рослинного матеріалу (Herman 2017), а коригувати ступінь окиснення фенолів можна шляхом обробки антиоксидантами (Irshad et al. 2018, Taghizadeh & Ganji Dastjerdi 2021). Також, оптимізація первинних етапів мікроклонування включає підвищення рентабельності цього процесу, чого можна досягнути як підвищенням коефіцієнту розмноження рослин, так і використанням більш вигідних реагентів для підвищення ефективності біотехнологічного процесу (Pozoga et al. 2019, Madzikane et al. 2022).

Актуальним питанням сьогодні залишається також підбір оптимальних концентрацій фітогормонів на різних етапах мікроклонування рослин роду *Paulownia*. Наприклад, Mohameed & Alkhalifa (2022) встановили, що формування найбільшої кількості пагонів у павловнії забезпечувало наступне співвідношення регуляторів росту: НОК 1 мг/л та тидіазурон 5 мг/л. Chunchukov & Yancheva (2015) рекомендували для ефективного розмноження фітогормон БАП 0,5 мг/л та ІМК 0,01 мг/л, а Ghatas (2016) визначив високу ефективність додавання гібереліну 1 мг/л та ІМК 1 мг/л під час укорінення для досягнення найбільшої

кількості коренів та висоти мікроклонів. Проте, єдиних загальноприйнятих рекомендацій використання регуляторів росту для розмноження павловнії створено не було.

Дослідження з покращення адаптації мікроклонованих рослин павловнії зосереджені, в основному, на підборі різноманітних ґрунтових сумішей. Наприклад, Mohamad et al. (2021) встановив, що найоптимальнішою для адаптації рослин роду *Paulownia* була суміш торфу з піском у співвідношенні 1:2. Chunchukov & Yancheva (2015) визначили субстрат з торфу та перліту (3:1) як ефективний для адаптації павловнії, а також рекомендували обробку мікроклонів фунгіцидами під час адаптаційного періоду. Загалом, кількість досліджень адаптації рослин павловнії до умов *ex vitro* є дуже обмеженою.

Ожина звичайна (*Rubus fruticosus* L.) – традиційна плодово-ягідна культура, що поступово стає все більш розповсюдженою в садах на території України. Рід *Rubus* налічує майже 700 видів, є самим великим у родині та включає декілька цінних господарських культур – у тому числі, малину та ожину (Marulanda et al. 2007). В останні роки серед населення збільшився інтерес до культивування ожини та малиново-ожинних гібридів. Ці рослини характеризуються великою урожайністю, ягоди - високими смаковими властивостями; і, на відміну від більш поширеної в Україні малини, менше піддаються хворобам (Jennings et al. 1991).

Ожина звичайна – харчова, медоносна, лікарська, кормова, фарбувальна, танідоносна, декоративна рослина (Kirina et al. 2020). Насадження ожини захищають ґрунт від ерозії, а плоди використовуються у різноманітних сферах виробництва: харчовій, косметичній промисловості, та у медицині деяких країн. З ягід ожини також отримують барвники, а зі стебла – волокно, що придатне для виготовлення мотузок (Fathy et al. 2018). Плоди ожини є джерелом цінних нутрієнтів, у тому числі, природних антиоксидантів. Флавоноїди та фенольні сполуки, виділені з ягід, мають антиканцерогенний та протизапальний ефект (Muhammad et al. 2014).

Популярними для культивування є безшипні сорти, що є зручними для збору врожаю та мають високу якість плодів. Традиційно ожина розмножується

верхівковими відводами, відприсками, корінними і зеленими черенками, розділенням куща (Caldwell 1984). Але успішне застосування вегетативного способу розмноження обмежено потребою великих площ для саджанців, додаткових зусиль для боротьби із бур'янами та інфекційними хворобами рослин (Baghdady 2021). Завдяки мікроклонуванню зазначені проблеми можуть бути легко вирішені, що дозволяє цілорічно отримувати великі партії здорових саджанців у межах відносно невеликої лабораторії (Shen et al. 1990). Сучасні методи біотехнології дозволяють здійснити швидке розмноження нових форм, сортів та навіть одиничних екземплярів рослин, які характеризуються цінними ознаками, і отримати оздоровлений садивний матеріал (Титаренко & Теслюк 2020b). Мікроклональне розмноження широко застосовується для масового розмноження багатьох цінних плодово-декоративних видів рослин та, зокрема, різних сортів Ожини звичайної (Vujovic et al. 2010).

Дослідження останніх років з удосконалення мікроклонування рослин роду *Rubus* направлені, здебільшого, на підвищення коефіцієнту розмноження та якості садивного матеріалу. Наприклад, Vujovic et al. (2010) встановили позитивний вплив тидіазурону на множинну проліферацію експлантів ожини у порівнянні із іншими типами цитокінінів. Lepse & Laugale (2009) показали, що під час введення в культуру *in vitro* оптимальним є застосування фітогормону БАП у концентрації 1 мг/л, під час живцювання – ІМК 0,05 мг/л та БАП 1 мг/л. Також вплив різноманітних концентрацій та типів регуляторів росту на мікроклони ожини широко вивчав Baghdady (2021) та встановив, що найбільшу кількість пагонів та свіжу масу мікроклонів забезпечує додавання у середовище БАП та кінетину у концентрації 1 мг/л.

Процеси поверхневої стерилізації експлантів ожини також досліджували як елемент оптимізації біотехнології її мікроклонального розмноження. Наприклад, Abdalla & Mostafa (2015) встановили ефективність обробки 40% розчином гіпохлориту натрію протягом 30 хвилин, що забезпечувало приживлюваність на рівні 90%. Проте, протоколи знезараження експлантів можуть значно варіювати

у залежності від місця відбору донорного матеріалу, тому удосконалення таких схем завжди залишається актуальним питанням.

Для розмноження ожини використовують різні живильні середовища, такі як Мурасіге і Скуга (Murashige & Skoog 1962), B5 (Gamborg et al. 1968) та WPM (Lloyd & McCown 1980), середовище Андерсона (Anderson 1980) та деякі інші (Samaan & Nasser 2022). Вплив концентрації агару на ріст експлантів рослин роду *Rubus* також було досліджено: Bosnjak et al. (2021) встановили високу ефективність вирощування мікроклонів малини в автоматизованій системі на рідкому середовищі із підвищенням коефіцієнту розмноження на 68%; Clara et al. (2021) також вивчали можливості розмноження малини у біореакторах на рідких середовищах та визначили, що найбільша довжина пагонів спостерігалася при культивуванні на рідкому середовищі, але проліферація бруньок буда вищою на агаризованому середовищі. Варто відзначити, що існують окремі дослідження адаптації мікроклонів ожини, що базуються, в основному, на підборі складу ґрунтової суміші для вирощування або складу середовища для ефективного укорінення мікроклонованих рослин: Lapse & Laugale (2009) визначили більш ефективним *ex vitro* укорінення у гороховому субстраті, ніж в асептичних умовах; Baghdady (2021) встановив, що найбільш ефективне коренеутворення спостерігалось за використання середовища МС у половинній концентрації солей із додаванням 1 мг/л НОК.

В цілому, різноманітність результатів досліджень по розмноженню ожини свідчить про суттєву залежність впливу різних факторів від генотипу рослини та умов культивування. Але, із наявних даних зрозуміло, що тільки методом мікроклонального розмноження можна досягти найбільших об'ємів виробництва садивного матеріалу ожини із бажаними характеристиками (Fathy et al. 2018).

Незважаючи на популярність методу мікроклонального розмноження, не існує універсальної схеми культивування *in vitro* для Ожини звичайної сорту Торнфрі та Павловнії повстяної, немає єдиної оптимальної схеми стерилізації ініціальних експлантів, або чітко встановленого співвідношення компонентів

живильних середовищ. Пошук нових підходів для оптимізації біотехнології мікроклонального розмноження залишається актуальним питанням.

Для культур *in vitro* обох вищезазначених рослин великою проблемою залишається ефективна адаптація мікроклонів, через що втрачається велика частка рослинного матеріалу та знижується економічна доцільність біотехнологічного процесу (Lepse & Laugale 2009; Chunchukov & Yancheva 2015). Враховуючи той факт, що мікроклоновані рослини не мають власної сформованої мікробіоти, і знаючи про важливість взаємодії мікроорганізмів та рослин у природі та вдалі приклади біотизації мікроклонів певних видів (Nowak 1998), можна припустити, що інокуляція мікроклонів ожини і павловнії корисними бактеріями на етапі адаптації до умов оточуючого середовища може підвищити приживлюваність саджанців у ґрунті та позитивно вплинути на зовнішні характеристики садивного матеріалу.

1.3. Використання мікроорганізмів у біотехнології рослин

Рослини у своєму природному навколишньому середовищі існування є «метаорганізмами» (Berg et al. 2014), також відомими як «суперорганізми» (Podolich et al. 2009), «пан-геноми» (Turner et al. 2013) або «голобіонти» (Hardoim et al. 2008; Rosenberg et al. 2010). Це означає, що одна рослина може розглядатися як окрема екосистема із складною мережею зв'язків між хазяїном-рослиною та його мікробіотою, а також цих мікроорганізмів між собою. Було доведено, що такий спосіб співіснування підвищує життєвий потенціал усіх симбіонтів (Rout et al. 2013).

Найбільше різноманіття бактерій, що контактують з рослинами, знаходиться у прикореневій зоні – її населяє величезний спектр мікроорганізмів, які тісно взаємодіють з рослинами за допомогою метаболітів. Саме через корені мікроорганізми найчастіше проникають всередину рослини, хоча, це можливо також і через інші вегетативні та генеративні органи. Вони часто колонізують всю рослину (Comrants et al. 2008) і можуть передаватися через покоління як вертикально – через статеве розмноження, так і горизонтально – через вегетативне (Partida-Martinez & Heil 2011).

Корені рослин та зона у декілька міліметрів навколо них формують ризосферу – складний комплекс взаємодій підземної частини рослини із мікробіотою ґрунту. За аналогією з цим терміном було створено також поняття філосфера – надземна частина рослин. У ризосфері зазвичай панує ендofітна мікробіота, а у філосфері - здебільшого епіфітна (Rosenberg et al. 2010).

Колонізація філосфери бактеріями проходить різними шляхами. Деякі з мікроорганізмів вже присутні у бруньках і є першими колонізаторами, але більшість із них потрапляє на поверхню надземної частини з вітром, дощем, пилом, частками ґрунту чи за допомогою комах (Maignien et al. 2014). При цьому, поверхня листа чи стебла є екстремальним середовищем існування. Протягом лише одного дня лист може знаходитися в сухому і вологому стані, температура може коливатися від спеки до холоду, режим освітлення також сильно змінюється протягом дня. У кінцевому рахунку, лист зів'яне та опадє, тому бактерії, що населяють його поверхню, мають бути здатними до виживання у широкому діапазоні умов. Ендofітна мікробіота, а особливо біота ризосфери, існує у набагато стабільніших умовах та тісніше взаємодіє із рослиною-хазяїном.

Ендofітами називають такі мікроорганізми, що живуть усередині живих тканин рослини протягом усього її існування чи певної частини життєвого циклу, не спричиняючи жодних симптомів захворювання (Wilson 1995). Ендofіти можуть впливати на фізіологічні процеси рослини у тій самій мірі, що й її власний генотип (Sessitsch et al. 2012), та слугувати джерелом різноманітних метаболітів (Brader et al. 2014; Ludwig-Müller 2015a). Таким чином, вивчаючи індивідуальні функціональні характеристики рослин, треба обов'язково брати до уваги не тільки ознаки, обумовлені генотипом рослини, а також ті, що обумовлені внеском генотипів ендofітів (Friesen et al. 2011). Деякі ендofіти відомі як високо специфічні до генотипу певної рослини, а інші мають широкий спектр потенційних хазяїв (Hardoim et al. 2011).

У природі, мікробіом зазвичай є специфічним для рослин одного виду, що ростуть в однакових умовах (Berg & Smalla, 2009). Тим не менш, видовий склад

ендофітів обумовлений низкою внутрішніх і зовнішніх факторів та є дуже різноманітним.

Деякі дослідники (Badri et al. 2013) вважають, що фенольні сполуки рослин та їх похідні, що виділяються коренями, можуть змінювати склад ризосферного мікробіому. Це підтверджує активну роль рослин у взаємодії з мікроорганізмами (Turner et al. 2013).

Проте, згідно з іншими дослідженнями, проведеними на *Nicotiana attenuata* (Santhanam et al. 2015), було показано, що головним фактором різноманіття бактерій у кореневій зоні є особливості ґрунту, з якого здійснюється проникнення мікроорганізмів у корені рослин.

При пошуку мікроорганізмів, корисних для рослин, важливим моментом є визначення їхньої специфічності стосовно рослин-хазяїв, а також можливостей одноманітного позитивного впливу у випадку несуворої специфічності (Ma et al. 2011). Будь-які варіанти є можливими через універсальність і варіативність метаболізму бактерій, та розноманітність можливих відповідних реакцій рослини, що дозволяють контролювати рівень бактеріальної колонізації у кількісному та якісному аспектах (Hardoim et al. 2008). Було досліджено декілька механізмів упізнавання мікроорганізмів рослинами, але кінцевий результат взаємодії завжди залежить від обох сторін – і сигналів, що вивільняє мікроорганізм, і рецепторів самої рослини (Carvalho et al. 2016).

Корисний вплив мікроорганізмів на рослини залежить від специфіки видових характеристик та взаємодій між ними. Певні представники здатні продукувати рослинні фітогормони (Friesen et al. 2011) та інші регулятори росту, невластиві рослинам у природніх умовах. На сьогодні відомо, що ауксини великої групи бактерій здатні безпосередньо впливати на розвиток кореневої системи рослин, посилюючи абсорбцію поживних речовин та води із ґрунту (Patten & Glick 2002). Так, досліді Vereecke et al. (2000) показали, що супернатант середовища за культивування *Rhodococcus fascians* складався з 11 окремих цитокінінів, що впливали на метаболізм рослин. В тому числі, цей вплив розповсюджувався на морфогенез *in vitro*.

Мікроорганізми здатні не тільки продукувати регулятори росту рослин, але й стимулювати синтез та розподіл цих сполук всередині рослини (Vacheron et al. 2013). Ауксини бактеріального походження, такі, як індоліл-оцтова кислота (ІОК), відомі як проміжний фактор формування рослинно-бактеріальних взаємодій (Sraeren et al. 2007; Ludwig-Müller 2015b). Бактеріальні гібереліни також підтримують ріст рослин незалежно та у взаємодії із іншими гормонами (Bottini et al. 2004). Цитокініни подовжують час асиміляційних процесів у листі, підвищуючи кількість продуктів фотосинтезу і замінюючи рослинні цитокініни, що продукуються у недостатній кількості через стресові умови середовища (Arkhipova et al. 2007). Giron et al. (2013) підкреслювали роль бактеріальних цитокінінів як ключових регуляторів ростових та захисних процесів.

Рівень стресового гормону етилену може знижуватися у рослині завдяки бактеріальній 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаміназі, таким чином, знижується сприйнятливість рослинного організму до стресів (Saleem et al. 2007; Saravanakumar et al. 2012).

Бактерії, асоційовані з резистентністю до хвороб, можуть також працювати як фактори біоконтролю. Зменшена сприйнятливість до патогенів може бути пов'язана із впливом конкурентної колонізації тканин, або з антибіозом – шляхом зміни метаболізму, знищення патогенів або їх токсинів чи факторів вірулентності завдяки активації систем резистентності рослини (Comrants et al. 2013).

Бактерії також можуть покращити метаболізм рослин, виробляючи позаклітинні леткі речовини (Kanchiswamy et al. 2015). Наприклад, *Bacillus subtilis* GB03 виробляє леткі метаболіти, які в довгостроковій перспективі стимулюють ріст, ефективність фотосинтезу, накопичення заліза і призводять до більшого врожаю насіння в *Arabidopsis thaliana* (Xie et al. 2009).

Захист від абіотичних стресів може бути результатом впливу речовин, які змінюють відповідь на стрес або стимулюють рослину активувати метаболічні реакції, пов'язані з толерантністю до стресу. Це такі речовини, як

осмопротектори – гліцин, бетаїн або пролін (Dimkpa et al. 2009; Grover et al. 2011).

Ендофітні бактерії також можуть брати участь у захисті фотосистем рослин від екстремальних умов навколишнього середовища шляхом активації гормонозалежної системи захисту рослин та покращення транспорту електронів у фотосистемі II (Burlak et al. 2013).

Однак, не завжди зрозуміло, чи прискорений ріст або підвищена стійкість є результатом виключно бактеріальних метаболітів, або також завдяки індукції генетичного апарату рослини цими метаболітами. На думку Ludwig-Müller (2015a), рослини та ендофіти є рівноправними партнерами у виробництві вторинних метаболітів і можуть взаємодіяти під час синтезу сполук та створювати речовини, нові для обох організмів. Наприклад, Scherling et al. (2009) встановили, що в культурах тканин тополі, інокульованої *Paenibacillus* sp. strain 22, зазнали змін 11 метаболітів рослини, а особливо ті, що стосувались засвоєння азоту.

Тісне співіснування мікроорганізмів та рослин спонукало дослідників до спроб імітації корисних симбіозів у рослинництві, включаючи мікроклональне розмноження. Прикладом ефективного практичного використання бактерій є дослід з *Agrobacterium* spp., що використовувалися як вектори для трансформації рослинних клітин *in vitro* (Ziemienowicz 2014).

Також, багато мікроорганізмів різних таксонічних груп було виділено з культур рослин *in vitro*, і принаймні деякі з них показали можливість збільшити темпи росту рослин або впливати на морфогенез.

Найважливіша роль корисних бактерій у сфері мікроклонування пов'язана з адаптацією клонованих рослин, що часто є складним етапом з великою часткою втраченого рослинного матеріалу. Слабо функціонуючі продихи, погано розвинені коренева система та фотосинтетичний апарат роблять адаптацію важкою для мікроклонів в нестерильних умовах зі змінними параметрами оточуючого середовища. Інокуляція рослин корисними бактеріями на останній

стадії мікроклонування або в період адаптації може допомогти подолати цю проблему (Nowak 1998; Vestberg & Cassells 2009; Panigrahi et al. 2015).

Бактерії різноманітних таксономічних груп у дослідженнях спричиняли позитивний ефект на процеси мікроклонування, та у деяких випадках були вивчені механізми, що відповідали за підвищення продуктивності рослин. Бактерії стимулювали подовження пагонів, збільшували масу пагонів, кількість листків, ріст додаткових пагонів, прискорювали вкорінення, збільшували кількість і довжину коренів, індукували соматичний ембріогенез та допомагали покращити адаптацію рослин до умов *ex vitro*.

Використання певних бактерій для підтримки росту рослин, біозахисту та у ролі біодобрив сьогодні є дуже перспективним напрямом. Це екологічно та економічно виправдано, оскільки дозволяє зменшити об'єми використання мінеральних добрив та пестицидів, а також скорочує витрати на їх виробництво. Бактеріальна інокуляція має особливе значення в так званому органічному рослинництві. Дуже багато видів бактерій було ідентифіковано як корисні для рослин опосередкованими методами, але їх реальна ефективність не була доведена на реальних рослинах, або такі дослідження взагалі не проводилися (Owen et al. 2015)

У технічному відношенні інокуляція експлантів під час культивування *in vitro* є відносно легкою, але є необхідність дотримання деяких умов стосовно таких параметрів, як щільність інокуляції та умови вирощування (Pillay & Nowak 1997; Ardanov et al. 2011). Внесення бактерій частіше не є раціональним на стадії розмноження *in vitro*, але може значно допомогти під час адаптації та додається на етапі висадки у субстрат після промивання коренів, або безпосередньо у ґрунт для вирощування. Приклади інокуляції включають *Bacillus* spp. для рослин банану (Suada et al. 2015; Silva et al. 2018), *Rhizobium* spp. для рослин акації (Balla et al. 1998) або *Bacillus* та *Pseudomonas* spp. для рослин цукрової тростини (Michavila et al. 2022). Ефект інокуляції до або під час адаптації буде залишатися також під час вирощування у відкритому ґрунті, позитивно впливаючи на ріст та

врожайність рослин постійною присутністю бактерій у рослинах або роботою захисних процесів, активованих ще на попередніх стадіях росту.

1.4. Перспективи застосування бактерій *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Actinobacteria* spp. для удосконалення біотехнології мікроклонування рослин

Бактерії роду *Bacillus*. Певні представники роду грампозитивних бактерій *Bacillus* виявляють здатність колонізувати рослини і тим самим позитивно впливати на їх ріст і розвиток. На теперішній час бацили є найбільш широко використовуваними бактеріями на ринку біопестицидів (Borriss 2011). В основному, це пов'язано з їх здатністю утворювати стійкі ендоспори, що дозволяє виробляти стабільні біопрепарати із тривалим терміном зберігання. Бактерії виду *B. subtilis*, а також подібні до них *B. amyloliquefaciens* та *B. pumilus*, виявились ефективними у сприянні росту рослин та біоконтролю рослинних патогенів.

Бактерії роду *Bacillus*, що використовуються як основа для створення біопрепаратів, відрізняються за характером метаболізму. Наприклад, *B. amyloliquefaciens* є суворим аеробом, у той час як *B. licheniformis* та *B. pumilus* – факультативні анаероби (Lugtenberg 2014). Різними є також і механізми стимулюючого та захисного впливу на рослини у мікроорганізмів цього роду. *B. firmus* GB126 здатний контролювати чисельність нематод у прикореневій зоні рослин (комерційна назва - BioNem AgroGreen), а препарат BioArc на основі *B. megaterium* використовується як фунгіцид (Borriss 2011). Бактерії виду *Paenibacillus polymyxa* здатні стимулювати ріст рослин шляхом синтезу фітогормонів (ІОК, цитокінінів, гіберелінів, етилену) та специфічних летких речовин. Вони також здатні до фіксації азоту та синтезу великого спектру вторинних метаболітів з антибактеріальними та фунгіцидними властивостями. Споріднений вид *P. mucilaginosus* здатний переводити нерозчинні мінеральні сполуки ґрунту у розчинний стан, вивільнюючи корисні для рослин йони натрію та фосфору (Borriss 2011).

Згідно із дослідженнями останніх років, (Nafis et al. 2019), перспективними щодо стимуляції росту та захисту рослин від патогенів є екстремофільні бактерії, а також інші мікроорганізми із незвичайних екологічних ніш. Вони зазвичай володіють специфічними адаптаціями до екстремальних умов існування, що виявляється у продукуванні унікальних біологічних речовин. Це може виявитися корисним для рослин, але потребує додаткових досліджень.

Одним з перших питань на шляху створення біопрепарату є ефективна колонізація рослини корисними бактеріями. Згідно з відомими на сьогодні дослідженнями (Fan et al. 2011; Budiharjo et al. 2014; Chowdhury et al. 2013), штучне внесення бактерій роду *Bacillus* у ґрунт чи безпосередньо на корені рослин є доволі ефективним, але різні види рослин колонізуються не в рівній мірі, а кількість інокульованих бактерій має тенденцію знижуватися з часом (Kröber et al. 2014).

Здатність бацил підтримувати процеси росту і розвитку неодноразово спостерігалася у дослідженнях (Borriss 2011), але знання про молекулярні основи цього ефекту ще далеко не з'ясовані. На сьогодні основними способами корисного впливу *Bacillus* spp. на рослини вважаються:

1. Триптофан-залежний синтез фітогормону ІОК (Idris et al. 2007; Talboys et al. 2014);
2. Леткі речовини, такі як 2,3-бутандіол та ацетоїн – вони включаються у біохімічні цикли рослини (Borriss 2011);
3. Синтез фітази – ферменту, що дозволяє отримувати розчинну форму фосфатів, доступну для рослин (Idris et al. 2002);
4. Продукти рибосомного (Scholz et al. 2014) та нерибосомного (Herzner et al. 2011) синтезу, що здійснюють біоконтроль фітопатогенів у ґрунті та стимулюють ІСР.

Особливо варто відзначити саме захист рослин шляхом синтезу антимікробних сполук. На сьогодні у цьому плані найбільш відомим є *B. amyloliquefaciens* FZB42. При інокуляції на листя салату цей мікроорганізм

ефективно пригнічував ріст фітопатогена *Rhizoctonia solani* (Chowdhury et al. 2013). Геномний аналіз показав, що приблизно 10% генома у цього штаму відповідають за синтез антимікробних метаболітів (Borriss 2013). Ці метаболіти представлені сполуками різного біохімічного походження і структури. Наприклад, циклічні ліпопептиди синтезуються поза рибосомами та є активними фунгіцидами (бациломіцин D), а також відповідають за формування матриксу під час утворення біоплівки бактерій (Chen et al. 2009). Антимікробні пептиди рибосомного синтезу, наприклад, плантазоліцин, показали здатність до інгібування росту споріднених грампозитивних бактерій, а також помірну активність проти нематод (Liu et al. 2013). У *B. amyloliquefaciens* FZB42 виявили також і бактеріоцини – амілоцикліцини (Scholz et al. 2014), що показав себе у дослідженнях як інгібітор патогена *Clavibacter michiganensis* та деяких грампозитивних бактерій.

У науковому середовищі довгий час вважалося, що антимікробні сполуки є у першу чергу відповідальними за стимуляцію росту та захист рослин. Але у подальшому було виявлено, що їх концентрація у ризосфері може бути недостатньою для ефективної дії проти патогенів (Debois et al. 2014). Тому більш вірогідним варіантом корисної дії на рослини вважається стимуляція ІСР рослини. Цей біохімічний захисний механізм починає активно працювати після контакту з патогеном (Doornbos et al. 2012). Було також показано, що леткі органічні речовини та циклічні ліпопептиди бактерій роду *Bacillus* є стимуляторами ІСР (Raaijmakers et al. 2010).

Наразі проводиться багато польових досліджень щодо впливу бактерій різних штамів роду *Bacillus* та препаратів на їх основі на рослини, а антагоністичні взаємодії з фітопатогенами та синтез метаболітів вивчаються в умовах *in vitro* в лабораторіях.

Бактерії роду *Enterococcus*. Молочнокислі бактерії – розповсюджена і таксономічно різноманітна група мікроорганізмів, що широко зустрічається у різноманітних природних середовищах (Tytarenko et al. 2023a). Бактерії деяких видів цієї групи вже використовуються у ролі агентів біоконтролю фітопатогенів

у ґрунті, стимуляторів росту рослин, біопестицидів, агентів ремедіації та біодобрив (Raman et al. 2022). Їх виділяють як з надземних частин рослин, так і з ризосфери, і саме біля коренів зазвичай спостерігається найбільше видове їх різноманіття (Fhoula et al. 2013). Окремими цікавими представниками рослинної ризосфери є бактерії роду *Enterococcus*, що на сьогодні є недостатньо вивченими у контексті асоціації з рослинами та вважаються представниками тимчасової мікробіоти (Svec et al. 2012; Kumar et al. 2016). Вони зустрічаються як частина ризосферних консорціумів (Strafella et al. 2021) та можуть бути важливою складовою стійкості рослин до біотичних та абіотичних стресів (Panwar et al. 2016).

Дослідження останніх років показали, що ентерококи є продуцентами бактеріоцинів – позаклітинних білків, що здатні знищувати бактерії близьких видів. У випадку з *Enterococcus spp.*, вдалося встановити, що їх бактеріоцини можуть вбивати або пригнічувати також і неспоріднені мікроорганізми (Okkers et al. 1999). Окрім того, ентерококи здатні до синтезу біосурфактантів, летких сполук та інших речовин, що пригнічують фітопатогенну мікробіоту, і тому можуть бути потенційними агентами біоконтролю фітопатогенів у ґрунті (David et al. 2018; Diaz et al. 2021; Chaurasia et al. 2021).

Також бактерії роду *Enterococcus* здатні продукувати речовини фітогормональної природи: ауксини, цитокініни, гіберреліни (Lee et al. 2015). Було також встановлено, що ентерококи здатні до синтезу АЦК-деамінази і фітогормонів навіть в умовах підвищеної солоності ґрунту, а тому покращують врожайність певних рослин в умовах засолення. Ентерококи періодично виявляють у ризосфері культурних рослин як частину консорціумів, при чому було показано, що саме у складі консорціумів ці бактерії проявляють свої рістстимулювальні властивості найбільш повно (Panwar et al. 2016).

Пошук та ідентифікація потенційно корисних для рослин ентерококів є дуже актуальним напрямом досліджень, спрямованим на підтримку принципів сталого сільськогосподарського виробництва (Cesa-Luna et al. 2019). З використанням рістстимулювальних та захисних мікроорганізмів для

культурних рослин можливо зменшити використання хімічних добрив, токсичних засобів для захисту рослин, та підвищити врожайність важливих агрокультур. Окрім того, потенційно корисні ентерококи можуть бути використані і для адаптації мікроклонованих рослин.

***Actinobacteria* spp.** Актинобактерії – інша таксономічна група мікроорганізмів, що сьогодні широко досліджується як можливий стимулятор росту та агент захисту рослин (Sadeghi et al. 2012). Велике різноманіття актинобактерій населяють ризосферу рослин та тісно з нею взаємодіють, що дає можливість характеризувати їх як бактерій-стимуляторів росту рослин (PGPB). При цьому, вони володіють як прямими, так і опосередкованими механізмами впливу на рослини. Серед відомих на сьогодні механізмів дії актинобактерій можна виділити наступні: синтез антибіотичних речовин (у тому числі, летких) та ферментів, що викликають гідроліз клітинної стінки фітопатогенних грибів; синтез фітогормонів, АЦК-деамінази, сидерофорів; солюбілізація фосфатів у ґрунті, гіперпаразитизм, сприяння симбіозу рослин з іншими корисними мікроорганізмами (Palaniyandi et al. 2013).

Актинобактерії є активними продуцентами антибіотиків: у них було ідентифіковано більше 10000 сполук з антибіотичними властивостями. Окрім того, близько 45% комерційних антибіотиків у світі отримують саме з актинобактерій (Liu et al. 2012). Така властивість дозволяє їм також ефективно здійснювати біоконтроль фітопатогенів у ґрунті. Наприклад, антибіотична речовина азаломіцин, синтезована *Streptomyces malaysiensis* MJM1968, може виступати альтернативою хімічним фунгіцидам у ґрунті (Jinhua et al. 2010). Ґрунт, що було оброблено фільтратом культури актинобактерій, збагаченим азаломіцином, після 14 діб експерименту містив на 80% менше грибової мікробіоти, ніж контрольні зразки ґрунту без обробки. Також було виявлено, що азаломіцин є стабільною сполукою у широкому діапазоні температур на рН, та виявляє інгібуючу дію на *Rhizoctonia solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Pestalotia* spp. та *Colletotrichum gloeosporioides* (Jinhua et al. 2010).

Актинобактерії також можуть синтезувати леткі сполуки, що пригнічують фітопатогенну мікробіоту. Виявлено, що *Streptomyces alboflavus* TD-1 продукував 27 різних сполук, що інгібували ріст грибів *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* та *Aspergillus ochraceu in vitro* (Wang et al. 2013). В цілому, леткі речовини бактерій роду *Streptomyces* мають дуже великий потенціал як біофунгіциди у сільському господарстві для культурних рослин (Wang et al. 2013).

Також одним із механізмів біоконтролю фітопатогенів актинобактеріями є синтез позаклітинних гідролітичних ферментів, що володіють здатністю розчиняти клітинні стінки та мембрани грибів та бактерій. Ці ферменти включають такі, як целюлаза, хітиназа, протеаза, глюканаза і фосфоліпаза. Рід *Streptomyces* є найбільш дослідженою групою актинобактерій, що продукує такі ферменти – на сьогоднішній день вивчено процеси експресії їх генів, впізнавання субстратів та роль ферментів у рості та розвитку актинобактерій (Chater et al. 2010). Варто відзначити, що продуценти хітиназ та глюканаз є важливими агентами контролю патогенних грибів у ґрунті (Liu et al. 2012).

Здатність до синтезу гідролітичних ферментів іноді поєднується з явищем гіперпаразитизму – деякі актинобактерії можуть отримувати поживні речовини за рахунок фітопатогенних мікроорганізмів, ослаблюючи їх інфекційний потенціал. Наприклад, у декількох штамів стрептоміцетів було виявлено антагоністичну активність до грибкових патогенів, що проявлялася одночасно шляхом лізису клітинних стінок та гіперпаразитизму (Palaniyandi et al. 2013b; Xue et al. 2013).

Пригнічення фітопатогенної мікробіоти може здійснюватися також шляхом конкуренції з нею за поживні речовини у ґрунті. Найбільш вивченою у цьому плані є конкуренція за залізо – відомо, що його концентрація у ризосфері дуже низька. Ті мікроорганізми, які продукують сидерофори з найвищою спорідненістю для колонізації прикореневого простору, витісняють тих, що синтезують сидерофори з меншою спорідненістю або не синтезують взагалі.

Такий механізм супресії фітопатогенів спостерігали у різних видів актинобактерій (Khamna et al. 2009, Verma et al. 2011).

Окрім того, біоконтроль фітопатогенів актинобактеріями відбувається і також за рахунок активації захисних механізмів резистентності самої рослини, як і у випадку з бактеріями роду *Bacillus*. Але актинобактерії можуть активувати захисні біохімічні реакції рослин не лише за механізмом ICR, але і HCR – так званого «вродженого» імунітету рослин, що зазвичай активується саме патогенами і є залежним від рослинного гормону стресу – саліцилової кислоти.

Наприклад, фільтрат культури *Streptomyces bikiniensis* HD-087 індукував системну резистентність в огірка проти фузаріозу, спричиненого *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum*. Обробка рослин підвищила рівень активності глюканаз, пероксидази і деяких інших важливих у захисті від фітопатогенів ферментів, а також рівень розчинних цукрів та хлорофіллу (Zhao et al. 2012).

Таким чином, актинобактерії володіють широким спектром механізмів впливу на рослинні захисні процеси. Не менш різноманітними є механізми стимуляції росту рослин цими мікроорганізмами.

Відомо, що актиноміцети синтезують фітогормони ауксинової та цитокінінової груп. Найчастіше виявляють саме продукцію ауксину ІОК (Lin & Xu 2013; Palaniyandi et al. 2013).

У багатьох видів актинобактерій була виявлена властивість фіксувати атмосферний азот, роблячи його доступним для рослин у ґрунті. Найбільш вивченим у цьому сенсі є рід *Frankia* (Yamaura et al. 2010). Проте, фіксація азоту широко представлена серед різноманітних груп актинобактерій, що детально вивчено у роботі Sellstedt & Richau (2013).

Як і бактерії роду *Bacillus*, певні актинобактерії здатні до синтезу АЦК-деамінази та солюбілізації фосфатів у ґрунті (Palaniyandi et al. 2013).

Варто відзначити, що продукція сидерофорів є одночасно ознакою, що допомагає здійснювати біоконтроль фітопатогенів у ґрунті та стимулювати ріст рослин за рахунок підвищення концентрації двовалентного заліза у прикореневій зоні. Актинобактерії є не просто активними продуцентами цих сполук, але і

синтезують сидерофори в несприятливих для рослин та інших мікроорганізмів умовах посухи та засолення (Sadeghi et al. 2012).

Актинобактерії також мають властивість сприяти симбіозу рослин та інших корисних мікроорганізмів. Наприклад, взаємодія *Streptomyces* spp. та мікоризних грибів є важливою для формування мікоризи, а відбувається вона за рахунок синтезу рістстимулювальних метаболітів для потенційних симбіонтів (Schrey et al. 2012). Деякі актинобактерії здатні сприяти симбіозу рослин та азотфіксуючих бактерій. *Streptomyces lydicus* WYEC108 може бути присутнім у бульбочках на коренях бобових разом із бактеріями роду *Rhizobium* та покращувати поглинання заліза та інших поживних речовин з ґрунту, що призводить до збільшення розмірів бульбочок та активності бактероїдів (Tokala et al. 2002).

Бактерії таксономічних груп *Bacillus* spp. та *Actinobacteria* spp. на сьогоднішній день успішно використовуються як основа для створення біопрепаратів для захисту рослин. Мікроорганізми роду *Enterococcus* ще не є постійними компонентами біопрепаратів для рослин, але активно досліджуються у цьому напрямку. Бактерії цих груп є природними мешканцями ґрунту і часто формують симбіотичні відносини з рослинами у ризосферній зоні. Способи позитивного впливу бактерій при цьому дуже різноманітні: це і синтез фітогормонів, антибіотиків, специфічних летких речовин, полегшення засвоєння мінеральних елементів з ґрунту, фіксація азоту тощо. Важливими є і механізми стимуляції захисних резервів рослин шляхом ICP та HCP (Boriss 2011).

У свою чергу, мікроклонально розмножені рослини особливо потребують захисту від хвороб та несприятливих умов, оскільки мають слабо розвинену кореневу систему та транспіраційний апарат, і позбавлені контакту з нестерильним повітрям та ґрунтом безпосередньо до етапу адаптації. Зважаючи на перелічені властивості, бактерії вищезазначених таксономічних груп володіють великим потенціалом щодо їх використання під час адаптації рослин до умов *ex vitro* для підвищення рівня приживлюваності, захисту від патогенів та пом'якшення стресових умов вирощування у відкритому ґрунті (Panigrahi et al. 2015).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Місце та загальна схема досліджень

Місце проведення досліджень. Експериментальну частину дисертаційної роботи виконано в Біотехнологічному науково-навчальному центрі та на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Загальна схема досліджень. У відповідності до проаналізованих джерел літератури (Висоцький 1986; Подгаєцький та ін. 2018; Kundu et al. 2022), було представлено загальноприйнятну біотехнологічну схему мікроклонального розмноження рослин (рис. 2.1.1).

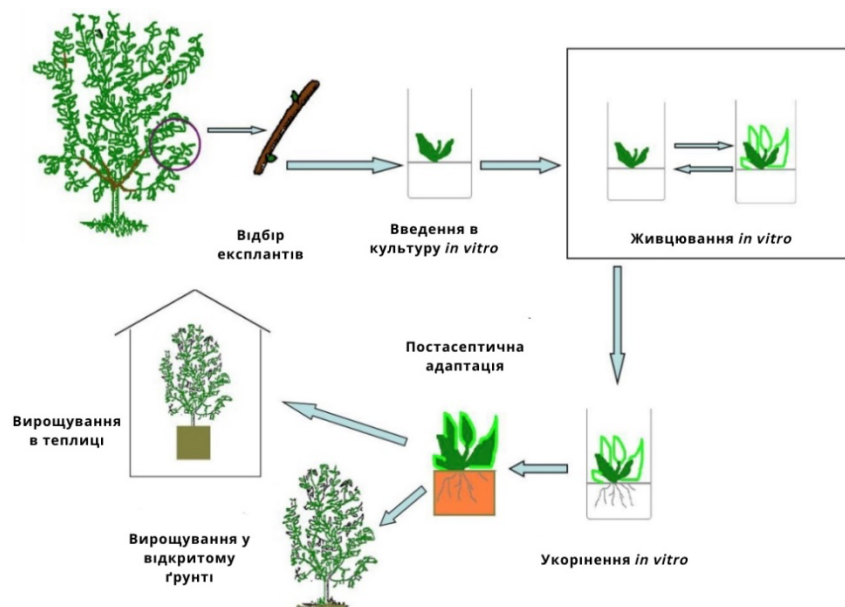


Рис. 2.1.1. Загальна біотехнологічна схема мікроклонування рослин

Ця схема слугувала основою для впровадження удосконалень процесу розмноження дослідних рослин. Загалом, оптимізація мікроклонального розмноження складалася із двох основних частин:

- 1) удосконалення мікроклонування *in vitro* за допомогою підбору оптимальних прийомів стерилізації експлантів та культивування мікроклонів на різних етапах;
- 2) вивчення впливу мікроорганізмів на процеси адаптації дослідних мікроклованих рослин до умов *ex vitro*, що включала

- а) відбір корисних для рослин бактерій за допомогою визначення їх антагоністичної активності до фітопатогенів та впливу на модельні рослини крес-салату *in vitro*;
- б) адаптаційні експерименти з інокуляцією коренів мікроклонів ожини та павловнії відібраними бактеріями.

План досліджень для удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *in vitro* дослідних рослин включав такі стадії (рис. 2.1.2):

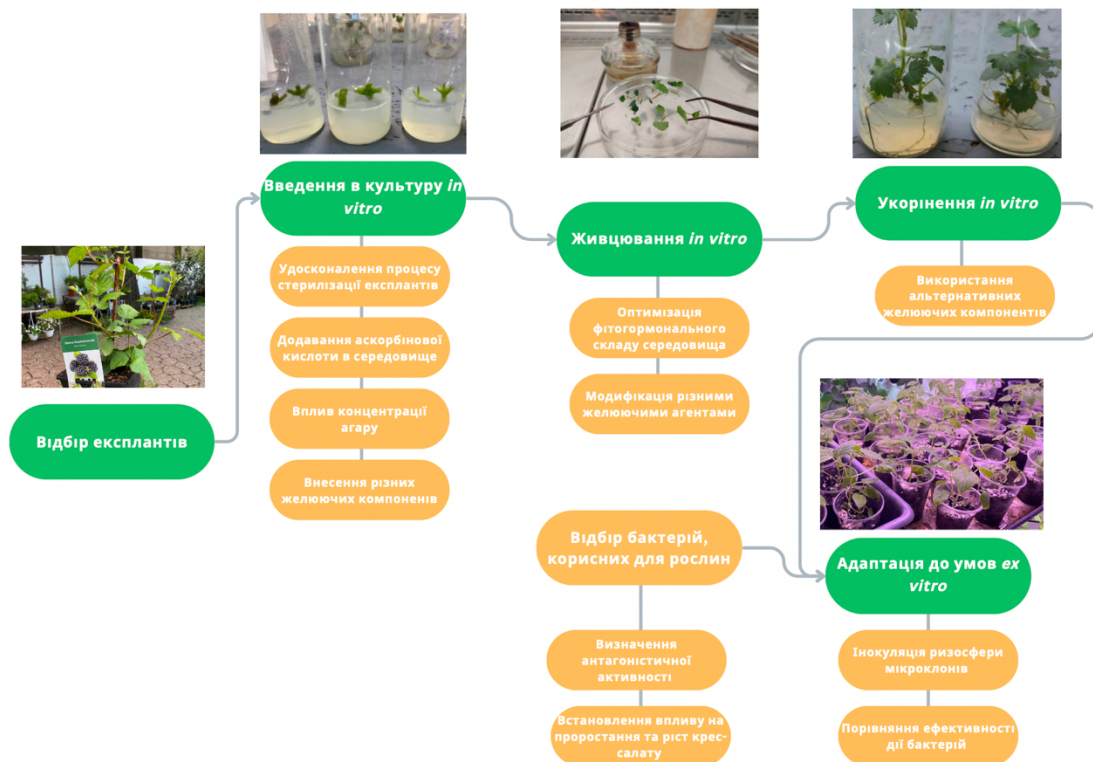


Рис. 2.1.2. Схема дисертаційного дослідження (зеленим кольором відмічено основні стадії мікроклонального розмноження, жовтим — дослід з удосконалення зазначених стадій)

Згідно зі створеною схемою дослідження та у відповідності до загальної біотехнології мікроклонування рослин, експерименти проводили за представленим планом та стадіями:

1. Удосконалення процесу введення ініціальних експлантів ожини та павловнії в культуру *in vitro*, що забезпечувало ефективну приживлюваність експлантів на живильному середовищі та покращувало їх ріст та розвиток.

На цій стадії проводили такі дослідження:

- 1.1. Відпрацьовували прийоми стерилізації експлантів з використанням фунгіцидів;
 - 1.2. Визначали оптимальну концентрацію аскорбінової кислоти у складі середовища МС для пом'якшення оксидативного стресу експлантів;
 - 1.3. Встановлювали вплив концентрації агару у живильному середовищі на ріст експлантів;
 - 1.4. Визначали можливість використання різних желуючих компонентів на первинних етапах мікроклонального розмноження для підвищення швидкості та ефективності біотехнологічного процесу.
2. Стерильне живцювання в культурі *in vitro*, що дозволяло за короткий час отримати більшу кількість живців.

На цій стадії виконували:

- 2.1. Оптимізацію фітогормонального складу середовища для покращення росту та проліферації бруньок мікроклонів.
 - 2.2. Модифікацію складу середовища різними желуючими агентами.
3. Укорінення в культурі *in vitro*.

На даній стадії мікроклони пересаджували на безгормональне середовище для укорінення. У даному випадку, також перевіряли можливість використання різних желуючих агентів.

4. Паралельно із вищезгаданими експериментами, проводили відбір потенційно корисних для рослин мікроорганізмів шляхом визначення антагоністичної активності бактерій до тест-штамів фітопатогенних міцеліальних грибів та виявлення захисного потенціалу і рістстимулювальної активності шляхом дослідження впливу бактерій на проростання насіння та ріст проростків модельної рослини – крес-салату *Lepidium sativum* L. *in vitro*.
5. Відібрані потенційно корисні мікроорганізми інокулювали на корені мікроклонів перед висадкою у ґрунт. На цій стадії вивчали ефективність адаптації отриманого клонованого матеріалу до умов *ex vitro*, а також ріст і

розвиток мікроклонованих рослин у ґрунті протягом тридцяти перших діб адаптації. У цілому, дослідили вплив на адаптацію 10 штамів та ізолятів мікроорганізмів, що належали до таксономічних груп *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*.

6. На стадії аналізу результатів, ефекти усіх дослідних бактерій на адаптацію мікроклонів ожини та павловнії порівнювали за критерієм ефективності та визначали найбільш перспективні для інокуляції рослин.
7. Завдяки впровадженню удосконалень на різних етапах мікроклонування запропонували ефективні біотехнологічні схеми мікроклонального розмноження ожини та павловнії в культурі *in vitro*.

2.2. Дослідні рослини

Вихідним рослинним матеріалом для досліджень біотехнології мікроклонування Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) слугували рослини ожини сорту Торнфрі, зареєстровані у 1966 році американськими селекціонерами. Саджанці ожини були придбані у ТОВ «Ваш Сад» у 2017-2018 роках та використані у подальшому як донорні рослини у біотехнологічних дослідженнях. Донорні рослини ожини вирощували в умовах закритого ґрунту у торф'яній ґрунтосуміші з додаванням річкового піску («Ґрунт Універсальний», ТзОВ «Річ Ленд», Україна) у вегетаційних посудинах об'ємом 3-5 л. Полив здійснювали два рази на тиждень водопровідною водою.

У ролі донорів вихідного матеріалу для удосконалення біотехнології розмноження Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) використовували рослини, що ростуть в умовах відкритого ґрунту на території Ботанічного саду ОНУ ім. І.І. Мечникова.

2.3. Використані мікроорганізми та умови їх культивування

Для пошуку рістстимулювальних та захисних для рослин бактерій були використані штами та ізоляти, що виділені науковцями БННЦ та зберігаються у колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ:

1. *Enterococcus italicus* ONU547 виділений к.б.н. Мерлічем А.Г. із ферментованої тайської капусти (Merlich et al. 2019). Штам задепоновано також у колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (ІМВ В-7776). Бактерії культивували в рідкому живильному середовищі MRS, або на MRS-агарі при 37 °C впродовж доби.
2. *Bacillus megaterium* ONU500 виділений к.б.н. Криловою К.Д. із ферментованого листа гірчиці (Babenko et al. 2016a). Бактерії вирощували на рідкому живильному середовищі LB в інкубаторі-шейкері при 28 °C та 180 об/хв, та на агаризованому середовищі LB при 28 °C впродовж 1-2 діб.
3. *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559 виділені к.б.н. Штеніковим М.Д. із донних відкладень Чорного моря (Іваниця та ін. 2021). Бактерії вирощували на рідкому живильному середовищі LB в інкубаторі-шейкері при 28 °C та 180 об/хв, та на агаризованому середовищі LB при 28 °C.
4. Ізоляти міцеліальних актинобактерій Conc2, Conc17, Conc11, Conc5, Conc18, Myt7b, Myt5, Myt4b, Myt7ch, Conc4, Conc32, Conc42, Myt8, Conc24, Lim4, Lim6.1, Conc10, Conc1, Conc8, Ku7, Ku8, Sea2, Conc9. Вони були ізольовані к.б.н. Васильєвою Н.Ю., к.б.н. Коротаєвою Н.В., Лісютіним Г.В., к.б.н. Страшновою І.В., к.б.н. Штеніковим М.Д. із зразків морського середовища Одеської затоки Чорного моря та Куяльницького лиману (Іваниця та ін. 2021). Актинобактерії культивували на агаризованих середовищах Гаузе 1, Гаузе 2, вівсяному агарі з морською сіллю впродовж 7-10 діб, або на рідкому середовищі Беннета протягом 7 діб в інкубаторі-шейкері при 28 °C та 180 об/хв. Для експериментів з адаптації мікроклонованих рослин було відібрано 5 ізолятів та ідентифіковано за 16S РНК як бактерії роду *Streptomyces*: *S. albidoflavus* Conc11, *S. pactum* Conc4, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch. Надалі в роботі вони згадуються також як «ізоляти Conc11, Conc4, Lim4, Conc32, Myt7ch».

Як тест-штами для визначення антагоністичної активності використано штами міцеліальних грибів, отримані з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: *Aspergillus niger* UKM F-16706, *Raecilomyces variotii* UKM F-424, *Cladosporium cladosporioides* UKM F-2235, *Penicillium expansum* UKM F-575, *Alternaria alternata* UKM F-16866, *Fusarium oxysporum* UKM F-54201. Штами *Rhizoctonia cerealis* ONU F-30, *Alternaria tenuissima* ONU F-24 отримали з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова. Представники вибраних видів грибів можуть спричиняти захворювання рослин у природних умовах, а також є частими контамінантами культур рослин *in vitro* (Omamor et al. 2007; Liu et al. 2021; El-Baky et al. 2021; Wang et al. 2021). Гриби вирощували на картопляно-глюкозному агарі (КГА) у термостаті за температури 28 °С від 2 до 5 діб.

2.4. Використані живильні середовища та хімічні препарати

Живильні середовища для вирощування рослин. *Середовище Мурасіге та Скуга (МС) базове* (Murashige & Skoog 1962): маточний розчин макроелементів – 50,0 мл/л, маточний розчин мікроелементів – 50,0 мл/л, розчин хелатного заліза – 5,0 мл/л, розчин вітамінів та органічних речовин – 5,0 мл/л.

Складові для приготування середовища МС. *Маточний розчин макроелементів:* NH_4NO_3 – 33,0 г/л, KNO_3 – 38,0 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 8,8 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 7,4 г/л, KH_2PO_4 – 3,4 г/л.

Маточний розчин мікроелементів: KI – 166,0 мг/л, H_3BO_3 – 1240,0 мг/л, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 4460,0 мг/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1720,0 мг/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 50,0 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5,0 мг/л, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5,0 мг/л

Маточний розчин хелатного заліза: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,5 г/л, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 7,5 г/л

Розчин вітамінів і органічних речовин: мезоінозит – 20,0 г/л, нікотинова кислота – 0,1 г/л, піридоксин – 0,1 г/л, тіамін – 0,1 г/л, гліцин – 0,4 г/л.

Варіанти середовищ МС для досліджень. *МС для введення в культуру in vitro:* МС базове, сахароза – 25,0 г/л, фітогормони для обох видів рослин – 6-бензиламінопурин (БАП) – 1 мг/л.

МС для культивування: МС базове, сахароза – 20,0 г/л, регулятори росту для ожини – 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК); для павловнії – 2,0 мг/л БАП та 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК). Дані концентрації фітогормонів для розмноження було встановлено як найефективніші у ході досліджень з оптимізації етапу стерильного живцювання павловнії та ожини.

МС для укорінення: $\frac{1}{2}$ МС базове, сахароза – 10,0 г/л, без додавання фітогормонів.

Для досліджень використовували тверді або напіврідкі агаризовані живильні середовища, що містили 0,8% або 0,4% агару, а також варіанти середовища МС із 7% кукурудзяного крохмалю чи 3% гуарової камеді. Значення рН всіх варіантів середовища МС встановлювали на рівні 5,7-5,9 перед стерилізацією. Середовища стерилізували автоклавуванням за 0,5 атм. Протягом 40 хв. Термолабільні компоненти, як, наприклад, аскорбінову кислоту, стерилізували шляхом фільтрування через стерильні шприц-фільтри із діаметром отворів 0,22 мкм.

Живильні середовища для вирощування бактерій. *Середовище MRS (De Man, Rogosa and Sharpe):* глюкоза – 20,0 г/л, протеозопептон – 10,0 г/л, м'ясний екстракт – 10,0 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, Твін-80 – 1,0 г/л, амонію цитрат – 2,0 г/л, натрію ацетат – 5,0 г/л, магнію сульфат – 0,1 г/л, марганцю сульфат – 0,05 г/л, натрію гідрофосфат – 2,0 г/л, вода дистильована – 1,0 л, агар (за необхідності) – 15,0 г/л.

Середовище LB (лізогенне середовище – від англ. Lysogeny broth): пептон – 10,0 г/л, дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, NaCl – 10,0 г/л, вода дистильована – 1,0 л, агар (за необхідності) – 15,0 г/л.

Середовище Гаузе 1: крохмаль розчинний – 20,0 г/л, KNO₃ – 1,0 г/л, K₂HPO₄ – 0,5 г/л, MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 г/л, NaCl – 0,5 г/л, FeSO₄ · 7H₂O – 0,1 г/л, агар – 20,0 г/л, вода дистильована – 1,0 л.

Середовище Гаузе 2: бульон Хоттінгера – 30,0 мл/л, пептон – 5,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л. Глюкоза – 10,0 г/л, агар – 20,0 г/л, вода дистильована – 970,0 мл.

Вівсяний агар з морською сіллю: пластівці вівсяні 20 г/л, розчин мікроелементів (ZnSO₄ · 7H₂O – 0,1 г FeSO₄ · 7H₂O – 0,1 г, MnCl₂ · 4H₂O – 0,1 г в

100,0 мл води дистильованої) – 1,0 мл, агар – 20,0 г/л; сіль морська – 20 г/л, вода дистильована 1,0 л.

Середовище Беннета: дріжджовий екстракт – 1,0 г/л, м'ясний екстракт – 1,0 г/л, ензиматичний гідролізат казеїну – 2,0 г/л, глюкоза – 10,0 г/л, вода дистильована – 1,0 л.

Живильне середовище для вирощування міцеліальних грибів.

Картопляно-глюкозний агар (КГА): очищена картопля – 200 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л, глюкоза – 20 г/л; CaCO_3 – 0,2 г/л; агар – 20 г/л; вода водопровідна – 1 л.

Використані в роботі препарати фунгіцидної дії. «Топаз» – пенконазол 100,0 г/л, ТМ Syngenta; «Фундазол» – беноміл 500,0 г/кг, ПП Dobrynia, Україна; «Хорус» – ципродиніл 750,0 г/кг, ТМ Syngenta; «Скор» – дифеноконазол 250,0 г/л, ТМ Syngenta; «Хінозол» – 8-хінолінолсульфат 98%, ТМ Shenzhen Horizon Industry.

2.5. Удосконалення мікроклонального розмноження рослин на первинних етапах

2.5.1. Введення експлантів павловнії та ожини в культуру *in vitro*

Як донорний рослинний матеріал для введення в культуру *in vitro* використовували однорічні нездерев'янілі пагони павловнії та ожини. У ролі ініціальних експлантів слугували вузлові сегменти рослин із пазуховими бруньками.

Відібрані пагони ділили на частини до 6-7 см висотою, видаляли прилистки і листки у бруньок для запобігання ризику додаткової контамінації рослинного матеріалу та покращення ефективності дезінфікуючої обробки. Після цього, у асептичних умовах ламінарного боксу здійснювали поверхневу стерилізацію експлантів, а потім пагони розрізали на сегменти з частиною стебла 0,3-0,5 см з обох боків від бруньки та культивували на середовищі МС для введення в культуру *in vitro* у скляних стерильних ємностях об'ємом від 100 мл до 200 мл, або у культуральних стаканах (рис. 2.5.1.1).

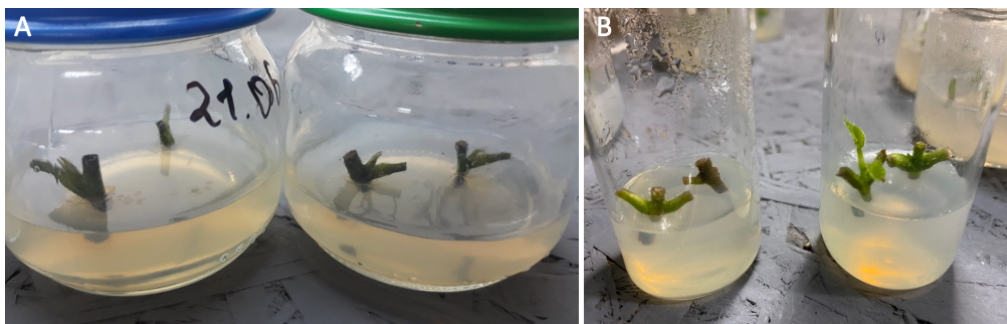


Рис. 2.5.1.1. Введення ініціальних експлантів ожини (А) та павловнії (В) у культуру *in vitro*

Культивування експлантів здійснювали в умовах культуральної кімнати за температури 24-26 °С, інтенсивності освітлення 2000 лк, відносній вологості 56-70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч.

Поверхнева стерилізація експлантів. Поверхнева стерилізація відібраного матеріалу здійснювалася за визначеною схемою: 10 хв – промивання у мильному розчині, 8 хв – витримання у 3,5% розчині гіпохлориту натрію, 5 хв – обробка 0,05% розчином хлоргексидину диглюконату. Після кожного етапу обробки експланти відмивали двічі у стерильній дистильованій воді, а після останнього – тричі.

Ця схема стерилізації вважалася контрольним варіантом, а експериментальні схеми мали також додатковий етап після промивання мильною водою – обробка рослинного матеріалу 20 хв у розчині певних протигрибкових препаратів. Були використані наступні комерційні препарати у зазначених концентраціях: Топаз – 1,0 мл/л; Фундазол – 1,0 г/л; Хорус – 1,4 г/л; Скор – 1,0 мл/л; Хінозол – 0,33 г/л.

Після стерилізації експлантів їх висаджували на середовище МС і протягом двох тижнів з дня початку культивування спостерігали на предмет наявності грибкової контамінації на середовищі, та реєстрували рівень приживлюваності. У кожній дослідній групі було 20 експлантів.

Рівень контамінації оцінювали у відсотках на 14-ту добу спостережень як частку експлантів, що стали джерелом видимого росту мікроорганізмів на середовищі МС від усіх висаджених в експерименті.

Рівень приживлюваності оцінювали як відсоток життєздатних експлантів, що демонструють ріст та розвиток відносно до усіх висаджених на 14-ту добу спостережень.

Додавання аскорбінової кислоти. Після встановлення оптимальної схеми стерилізації було проведено досліди зі зменшення оксидативного стресу рослин в культурі *in vitro*, спричиненого виділенням фенолоподібних речовин. Для цього використовували різні концентрації аскорбінової кислоти, що додавали у середовище МС після автоклавування. Дослідні концентрації в експерименті складали 1,0 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 50,0 мг, 100,0 мг та 200,0 мг аскорбінової кислоти на літр середовища, контролем слугувало середовище без додавання дослідної речовини. На кожен варіант середовища висаджували 12 експлантів. Спостереження вели протягом 28 днів, відмічаючи рівень приживлюваності експлантів, початок проліферації від моменту висадки на середовище та кількість сформованих пагонів на експлант.

Початок проліферації оцінювали як кількість діб від початку культивування, що були необхідні для візуально видимої активації росту бруньок на висаджених експлантах. Кращими вважалися більш ранні строки початку проліферації.

Концентрація желуючого агенту. Іншим етапом оптимізації первинних етапів культивування павловнії та ожини *in vitro* було визначення впливу концентрації агару у середовищі МС на ініціальні експланти під час введення в культуру. Зазвичай для культивування на усіх стадіях мікроклонування рослин використовуються тверді агаризовані середовища, проте деякі дослідження показали кращий ріст та розвиток експлантів на напіврідкому середовищі (Alkhateeb & Alturki 2014; Matos et al. 2020). Окрім того, для приготування напіврідкого середовища потрібно вдвічі менше агару, який є досить вартісним реагентом, тому зменшення концентрації його потенційно знижує вартість біотехнологічного процесу та майбутніх саджанців. У нашому дослідженні як контроль для введення ініціальних експлантів павловнії та ожини в культуру *in vitro* використовували звичайне тверде середовище МС з 0,8% агару, а у ролі експериментального напіврідкого варіанту – МС з 0,4% агару у складі.

Висаджували по 20 експлантів на кожен варіант середовища та вели спостереження протягом 28 діб, відстежуючи рівень приживлюваності, строки початку проліферації та кількість утворених пагонів на одному експланті.

Кількість утворених пагонів на експланті вимірювалась як відношення кількості бруньок, що проліферували, до усіх висаджених живих експлантів на визначену добу спостережень. Оскільки на одному експланті знаходилося 2 бруньки, то цей показник за час культивування міг коливатися в діапазоні від 0,0 до 2,0 новоутворених пагонів.

Використання альтернативних желюючих компонентів. З метою покращення економічності та ефективності мікроклонування павловнії та ожини було випробувано кукурудзяний крохмаль (КК, ДСТУ 3976-2000) та гуарову камедь (ГК, ДСТУ 2458-019-57258729-2006) як желюючі агенти-замінники агару. Середовище МС для введення готували із 7% КК та 3% ГК. Напіврідке агаризоване середовище із 0,4% агару слугувало контролем. Оцінювали такі показники, як приживлюваність, строки початку проліферації та кількість сформованих вузлів та пагонів у порівнянні з напіврідким агаризованим середовищем із 0,4% агару.

2.5.2. Проведення стерильного живцювання та укорінення мікроклонів дослідних рослин

Живцювання новоутворених пагонів та висадку на живильне середовище проводили в умовах стерильних ламінар-боксів. Вирощування мікроклонів *in vitro* здійснювали в скляних ємностях об'ємом 100-200 мл, або в культуральних стаканах різного об'єму в умовах культуральної кімнати за температури 24-26 °С, інтенсивності освітлювання 2000 лк, відносній вологості 56-70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч. Джерелом рослинного матеріалу на цьому етапі слугували живці, отримані з попереднього живцювання або після етапу введення в культуру *in vitro* (рис. 2.5.2.1).

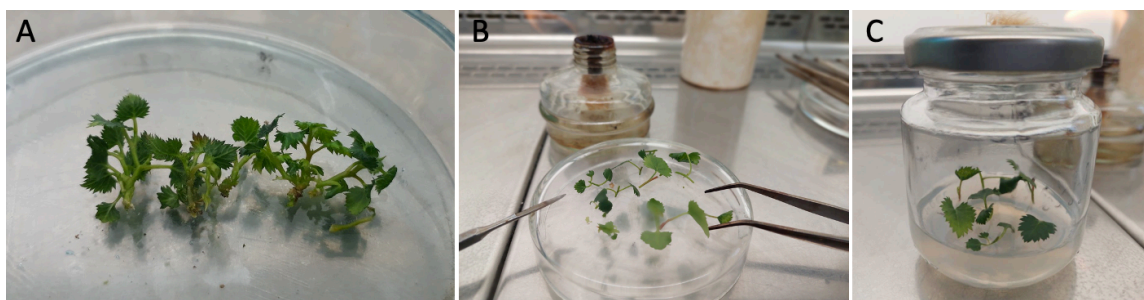


Рис. 2.5.2.1. Стерильне живцювання ожини в культурі *in vitro*: А – новоутворені пагони; В – живцювання у ламінарному боксі; С – культивування живців на середовищі МС

Стадія мікроклонування складалася із 4-5 послідовних циклів живцювання, і кожен цикл включав наступні складові:

- 1) вилучення новоутвореного пагону із живильного середовища в стерильних умовах ламінар-боксу;
- 2) розрізання пагону на одновузлові живці висотою 0,8-1 см, що містили дві бруньки у листових пазухах;
- 3) експлантація рослинного матеріалу на нове живильне середовище МС для культивування
- 4) ріст експлантів на свіжому середовищі МС протягом 25-35 діб для утворення та розвитку нових пагонів.

Таким чином, один цикл стерильного живцювання продовжувався, в середньому, 30 діб. З метою укорінення живці, що пройшли 30-денний цикл культивування, переносили на середовище МС для укорінення. Зазвичай, коренева система формувалася протягом 14-20-денного періоду культивування. Мікроклони, що сформували кореневу систему та досягли висоти пагону (в середньому) 3,5-4,5 см для ожини та 4,5-5,0 см для павловнії, вважалися придатними до адаптації у ґрунті.

Співвідношення та кількість фітогормонів. На стадії власне мікроклонування важливо було визначити оптимальні концентрації та співвідношення фітогормонів, щоб оптимізувати швидкість росту та якість майбутніх саджанців павловнії та ожини.

У ролі цитокініна для культивування рослин використовували БАП у концентраціях 1,0 мг/л, 1,5 мг/л, 2,0 мг/л, а як ауксини – ІОК у концентраціях 0,25 мг/л та 0,5 мг/л, і НОК у концентраціях 0,25 мг/л та 0,5 мг/л. Таким чином, рослини обох дослідних видів на етапі живцювання культивували на семи варіантах середовища МС: 1) 1,0 мг/л БАП та 0,25 мг/л НОК; 2) 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК; 3) 2,0 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК; 4) 1,0 мг/л БАП та 0,25 мг/л ІОК; 5) 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК; 6) 2,0 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК; контрольне середовище МС для культивування без фітогормонів.

На кожен варіант середовища МС висаджували 20 одновузлових живців та на 28-у добу з моменту експлантації вимірювали висоту мікроклонів та кількість сформованих вузлів та пагонів.

Застосування різних желюючих агентів. Середовище МС для культивування готували із 7% КК та 3% ГК. Тверде агаризоване середовище із 0,8% агару слугувало контролем. Кількість фітогормонів для мікроклонування залишалась однаковою для всіх варіантів та була на рівні найкращого експериментально визначеного варіанту для кожного виду рослин.

Спостереження вели протягом чотирьох тижнів, та на 28-у добу культивування вимірювали висоту мікроклонів та кількість сформованих вузлів і пагонів. На кожен варіант середовища висаджували 20 експлантів.

Середовище МС для укорінення також готували із різними желюючими агентами тих самих концентрацій, та оцінювали утворення коренів мікроклонами у відсотках як відношення частки тих, що сформували корені, до усіх висаджених на живильне середовище мікроклонів.

2.6. Визначення антагоністичних властивостей дослідних бактерій до міцеліальних грибів

Антагоністичну активність дослідних бактерій до міцеліальних грибів визначали методом агарових блоків (Білай 1982). Бактерії вирощували суцільним газоном на відповідному твердому агаризованому середовищі. *E. italicus* ONU547 культивували на MRS-агарі за температури 37 °С впродовж доби, усі бактерії роду *Bacillus* – на LB-агарі при 28 °С протягом 2 діб, а ізоляти

актинобактерій – на трьох варіантах середовищ Гаузе 1, Гаузе 2 та вівсяному агарі при 28 °С протягом 10 діб. Після цього вирізані з агарової пластинки блоки з бактеріями поміщали в чашки Петрі на середовище КГА, щойно засіяне спорами гриба. На одну чашку Петрі наносили не більше 5 блоків діаметром 12 мм.

Для отримання посівного матеріалу міцеліальні гриби культивували до стадії спороношення: *A. niger* UKM F-16706, *P. expansum* UKM F-575 та *F. oxysporum* UKM F-54201 впродовж 2 діб, *P. variotii* UKM F-424, *C. cladosporioides* UKM F-2235, *R. cerealis* ONU F-30 – 3 доби, а *A. alternata* UKM F-16866 та *A. tenuissima* ONU F-24 – 5 діб. Суспензії спор грибів готували у стерильному фізіологічному розчині та засівали на середовище КГА, як описано (Shobha & Kumudini, 2012). Після нанесення агарових блоків чашки з бактеріями та грибами залишали для культивування у термостаті впродовж 5 діб при 28 °С та вимірювали діаметри зон затримки росту.

2.7. Дослідження впливу бактерій на ріст модельних рослин крес-салату *in vitro*

Здатність дослідних бактерій до стимулювання росту рослин визначали на модельному об'єкті – крес-салаті *Lepidium sativum* L. (виробник насіння – ТМ SeedEra, Україна). Для цього вивчали вплив інокуляції бактеріями на проростання насіння, а також біометричні характеристики проростків крес-салату. З цією метою, усі бактерії вирощували на рідких живильних середовищах в інкубаторі-шейкері при 180 об/хв.

E. italicus ONU547 культивували при 37 °С впродовж доби в рідкому середовищі MRS, після чого центрифугували 30 хв при 3500 g, відмивали двічі у стерильній воді та готували суспензії клітин з концентраціями 10^6 , 10^7 та 10^8 КУО/мл, які використовували для інокуляції. Бактерії роду *Bacillus* вирощували на рідкому середовищі LB при 28 °С протягом доби, центрифугували 30 хв при 3500 g, відмивали двічі у стерильній воді та готували суспензію клітин для інокуляції концентрацією 10^8 КУО/мл. Актинобактерії вирощували в середовищі Беннета при 28 °С протягом 7 діб, центрифугували 30 хв при 3500 g, відмивали

двічі стерильною водою та готували суспензії біомаси концентрацією 10^7 КУО/мл, що використовувались для інокуляції насіння крес-салату.

Концентрації клітинних суспензій, що використовувались в експериментах, було підібрано згідно з джерелами літератури (Errakhi et al. 2007; Chung et al. 2015). Оскільки про застосування ентерококів як стимуляторів росту та агентів захисту рослин відомо найменше, ми тестували на рослинах три різних концентрації цих бактерій.

Насіння крес-салату стерилізували за допомогою 3,5% розчину гіпохлориту натрію 20 хв, після чого тричі промивали дистильованою водою. Потім насіння витримували у суспензіях клітин дослідних бактерій протягом години і поміщали для проростання у стерильні вологі камери. Контролем слугувало насіння, що витримували у дистильованій воді. Культивування проростків здійснювали в умовах культуральної кімнати. Спостереження проводили протягом 9 діб, вимірюючи довжину пагонів і коренів проростків, а також визначали відсоток проростання та кількість коренів.

2.8. Адаптація мікроклонованих рослин павловнії та ожини до умов *ex vitro* з використанням відібраних мікроорганізмів

Адаптацію проводили у два етапи. Переадаптаційний етап мікроклонів становив 5 діб, під час яких відкривали отвори у кришках ємностей з мікроклонами для встановлення газообміну із атмосферою (у перші три дні діаметр отвору складав 0,5 см, у наступні два дні – 1 см). Це сприяло налагодженню процесів транспірації у більш сухому повітрі порівняно до високої вологості в культурі *in vitro* (Leite et al. 2021). Після 5 діб, рослини обережно виймали з середовища, а його залишки відмивали стерильною водою. Мікроклони розподіляли на три групи по 20 рослин у кожній. Корені мікроклонів інокулювали дослідними бактеріями за допомогою витримування протягом години у суспензії мікроорганізмів. Корені рослин контрольної групи експонували годину у дистильованій воді. Суспензії бактерій готували тим самим чином, що і для досліду на рослинах крес-салату. Для бактерій ентерококу в адаптаційних експериментах використовували лише дві концентрації суспензій

10^6 та 10^7 КУО/мл, оскільки під час попередніх дослідів найбільш концентрована суспензія бактерій 10^8 КУО/мл показала негативний вплив на проростання насіння крес-салату.

Інокульовані мікроклони висаджували у простерилізовану гарячим паром торфосуміш «Ґрунт Універсальний» (ТЗОВ «Річ Ленд», Україна). За інформацією виробника, субстрат складається із суміші верхових і низинних торфів та річкового піску. Для адаптаційних експериментів використовували цю торфосуміш із додаванням агроперліту (ТОВ «Декор-Престиж», Україна) у співвідношенні 10:1, і культивували висаджені рослини в умовах адаптаційного боксу за температури 22-24 °С, інтенсивності освітлення 2000-2500 лк, відносній вологості 55-70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч, в окремих пластикових контейнерах об'ємом 200 мл для кожної рослини. Пластикові ємності для висадки рослин перед використанням ополіскували 3,5% розчином гіпохлориту натрію, а потім – стерильним дистилятом, та висушували.

У перші 7 діб адаптації у ґрунті рослини накривали поліетиленовою плівкою. Полив здійснювали стерильною водопровідною водою 2 рази на тиждень впродовж перших двох тижнів, а потім – не стерильною водопровідною водою. Спостереження після висадки проводили протягом 30 діб. На 7-му, 14-ту та 30-ту добу культивування вимірювали показники росту та розвитку досліджуваних рослин: приживлюваності, середньої висоти надземної частини, середньої кількості вузлів та площі листа (рис. 2.8.1).

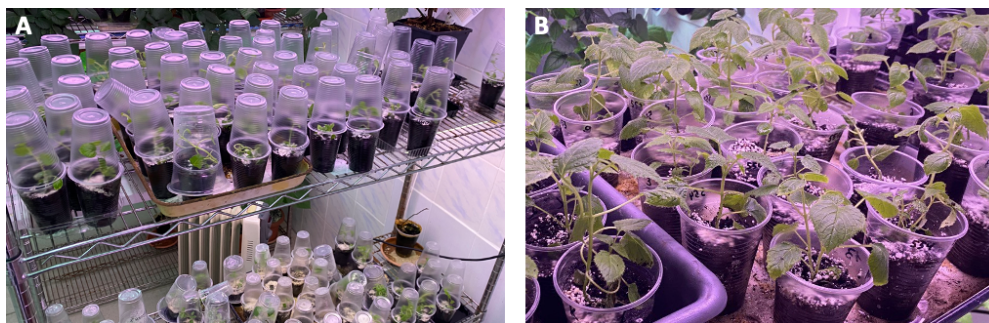


Рис. 2.8.1. Процес постасептичної адаптації мікроклонів павловнії: А – протягом першого тижня; В – після трьох тижнів адаптації

Показник приживлюваності оцінювали у відсотках як частку життєздатних рослин від усіх висаджених у експериментальній групі. Середню висоту надземної частини та кількість вузлів вимірювали вручну. Для визначення середньої площі листа використовували програму ImageJ, як описано Cosmulescu et al. (2020).

Після 30-35 діб росту рослини пересаджували у пластикові контейнери об'ємом 500 мл і дорощували до висоти 18-22 см, після чого вони вважалися готовими до пересадки в умови відкритого ґрунту.

2.9. Порівняння впливу різних бактерій на адаптацію мікроклонів дослідних рослин за критерієм ефективності

Для визначення найбільш ефективних за аналізованими показниками бактерій, було здійснено їх порівняння у відсотковому співвідношенні до контрольних неінокульованих рослин. Наприклад, висоту контрольних рослин на певну добу спостережень визначали як 100%, а ефективність впливу бактерій на висоту мікроклонів вираховували за формулою:

$$E = \frac{a}{b} \times 100\% - 100\%$$

Де Е – це ефективність впливу бактерій на показник, а – значення показника у експериментальній групі, b – значення показника у контрольній групі. Таким чином, враховуючи те, що рослини в усіх адаптаційних експериментах вирощувалися в однакових умовах, із заміною біометричних показників на відсоткові співвідношення стало можливим порівняння ефективності впливу на адаптацію мікроклонів усіх дослідних бактерій: *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 та ізолятів актинобактерій Conc11, Myt7ch, Conc4, Conc32 і Lim4 із визначенням найбільш перспективних.

В результаті проведеної роботи, для обох дослідних видів рослин було складено удосконалені біотехнологічні схеми мікроклонального розмноження. З метою оцінки ефективності удосконалення етапів біотехнологічного процесу для дослідних рослин в культурі *in vitro*, на кожній стадії було розраховано

коефіцієнт розмноження. Його визначали у перерахунку на один ініціальний експлант як максимальну кількість вузлів, що можна було отримати з живця на певному біотехнологічному етапі. На стадіях укорінення та адаптації, кількість отриманих на попередніх етапах мікроклонів помножувалася на відсоток успішно укорінених та адаптованих рослин для встановлення кількості одиниць садивного матеріалу, що потенційно можливо отримати з одного донорного експланта за умов повного дотримання усіх стадій біотехнологічної схеми.

2.10. Статистична обробка результатів

Усі експерименти було проведено у трьох повторях, рослинний матеріал розподіляли шляхом випадкового відбору. Статистичну обробку результатів виконували шляхом дисперсійного аналізу (ANOVA) у програмному забезпеченні IBM SPSS Statistics Grad Pack 29.0 (Lawal 2014). У випадку наявності більше ніж двох дослідних груп проводили порівняння середніх значень шляхом багатодіапазонного тесту Дункана (DMRT).

Статистична достовірність різниці середніх значень у рисунках та таблицях позначена за допомогою літер латинського алфавіту. Якщо середні значення аналізованої дослідної ознаки містять у позначенні хоча б одну спільну літеру, це означає статистично недостовірну різницю між ними.

У всіх випадках виявлену різницю з контролем вважали достовірною при $p \leq 0,05$. Побудову графіків здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel.

РОЗДІЛ 3. УДОСКОНАЛЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ПАВЛОВНІЇ ТА ОЖИНИ НА ПЕРВИННИХ ЕТАПАХ

3.1. Використання фунгіцидних препаратів на етапі введення ініціальних експлантів павловнії та ожини в культуру *in vitro*

У результаті проведених досліджень встановлено, що три з п'яти дослідних протигрибкових препаратів для додаткової поверхневої стерилізації експлантів зменшували рівень контамінації під час введення павловнії в культуру *in vitro* (рис. 3.1.1А).

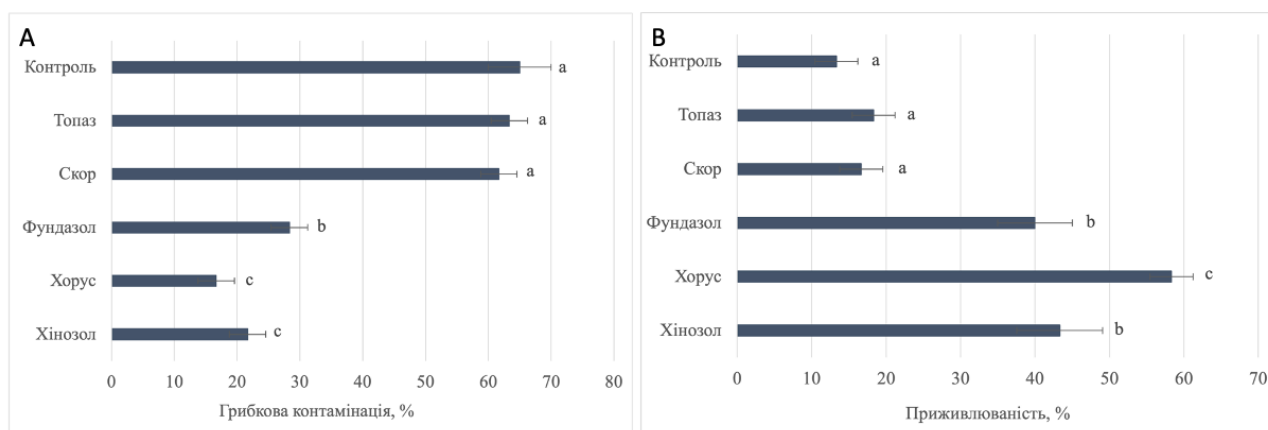


Рис. 3.1.1. Ступінь грибкової контамінації (А) та приживлюваності (В) експлантів павловнії під час введення в культуру *in vitro* за обробки фунгіцидними препаратами

У павловнії грибкова контамінація у контрольному варіанті була дуже високою – $65,0 \pm 5,0\%$. В експериментальних групах після обробки препаратами Хінозол, Фундазол і Хорус інфікування було меншим на 43,3%; 36,7% та 48,3%, відповідно. При цьому, Хорус і Хінозол статистично не відрізнялися за впливом між собою та показали найнижчий рівень контамінації в експерименті. За використання Фундазолу інфікування було більшим за два вищезгадані препарати, але все ще значно відрізнялося від контролю. У свою чергу, фунгіциди Скор і Топаз не виявилися ефективними препаратами для запобігання контамінації і показали ступінь видимого інфікування на рівні з контрольною групою.

Додатковим показником впливу фунгіцидних препаратів була оцінка рівня приживлюваності ініціальних експлантів (рис. 3.1.1B).

Приживлюваність експлантів павловнії у контролі знаходилась на рівні $18,3 \pm 2,9\%$, а у варіантах з фунгіцидними препаратами підвищувалась на $30,0\%$; $26,7\%$ та $45,0\%$ відповідно, для Хінозола, Фундазола та Хоруса. При цьому найкращий ефект спостерігали за використання препарату Хорус, а Фундазол та Хінозол показали однаковий, але трохи менший за попередні препарати рівень впливу. Фунгіциди Скор і Топаз не мали статистично достовірного впливу на приживлюваність експлантів у порівнянні з контролем.

Таким чином, встановлено, що використання дослідних фунгіцидних препаратів як додаткового етапу стерилізації експлантів павловнії дозволило суттєво зменшити рівень видимої грибової контамінації та підвищити приживлюваність під час введення в культуру *in vitro*. Визначено, що для розмноження павловнії найефективнішим був препарат Хорус (ципродиніл), обробка яким дозволила контролювати рівень грибового інфікування на рівні $16,7 \pm 2,9\%$, а рівень приживлюваності – $58,3 \pm 2,9\%$. Обраний препарат було включено у стандартну схему стерилізації ініціальних експлантів павловнії як елемент удосконалення біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження цих рослин.

Для рослин ожини сорту Торнфрі результати застосування фунгіцидів виявилися дещо іншими. Встановлено, що всі п'ять дослідних фунгіцидних препаратів різною мірою зменшували рівень контамінації під час введення експлантів в культуру *in vitro* (рис. 3.1.2A).

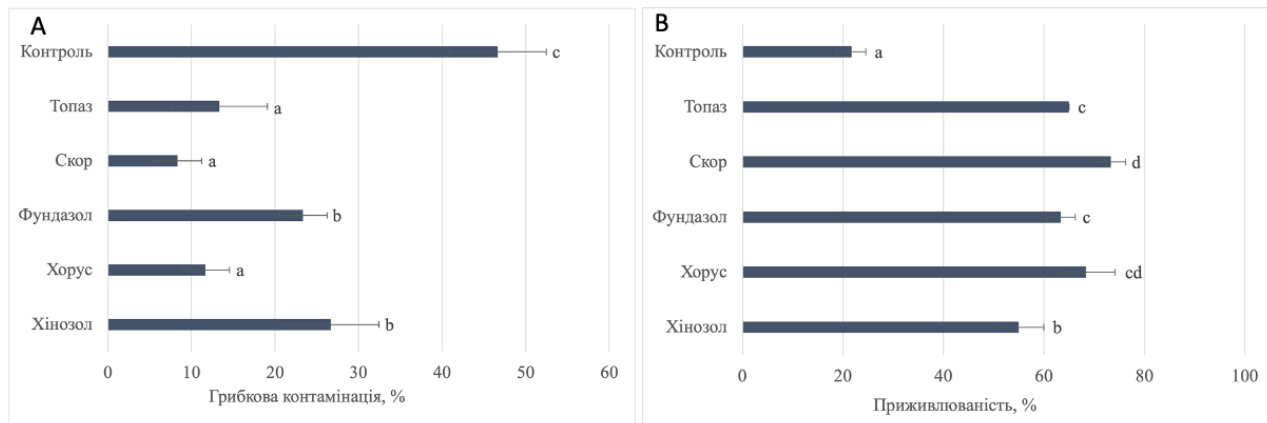


Рис. 3.1.2. Ступінь грибкової контамінації (А) та приживлюваності (В) експлантів ожини під час введення в культуру *in vitro* за обробки фунгіцидними препаратами

У експлантів ожини грибкове інфікування у контрольному варіанті було нижчим за культуру павловнії та складало $46,7 \pm 5,8\%$. У експериментальних групах з препаратами Фундазол і Хінозол контамінація була меншою на 23,4% та 20,0%, відповідно. При цьому, вплив обробки експлантів цими препаратами статистично не відрізнявся між собою і показав середній рівень контамінації в експерименті. За використання препаратів Топаз, Хорус і Скор, грибкове інфікування було найнижчим в експерименті – на 33,4%; 35,0% та 38,4% менше за контрольні значення.

За показником рівня приживлюваності ініціальних експлантів використання усіх дослідних фунгіцидних препаратів також вплинуло позитивно (рис. 3.1.2В).

Приживлюваність експлантів ожини у контролі знаходилась на рівні $21,7 \pm 2,9\%$, а у варіантах обробки Хорусом та Скором підвищувалась на 46,6% та 51,6%, відповідно. За використання фунгіцидів Топазу, Фундазолу і Хінозолу приживлюваність підвищувалася в середньому, на 33,3-43,3%.

Таким чином, враховуючи комбінований вплив фунгіцидних препаратів на рівень контамінації та приживлюваності, найбільш оптимальними варіантами для поверхневої стерилізації експлантів ожини виявилися фунгіциди Хорус і Скор, хоча усі випробувані препарати показали позитивний ефект і також можуть використовуватися у разі відсутності доступу до більш ефективних фунгіцидів.

Отримані результати співвідносяться з роботою Al Ghasheem et al. (2018), де використання фунгіцидів для поверхневої стерилізації експлантів було ефективним для запобігання контамінації. У даному дослідженні найкращий дезінфікуючий ефект мав 15% гіпохлорит натрію, проте у наших експериментах така концентрація даної речовини призводила до некрозу та загибелі експлантів, тому фунгіциди у даному випадку були більш прийнятними. Також, протокол

стерилізації із включенням фунгіциду використовували Oo et al. (2018), що дозволяло зберігати приживлюваність експлантів полуниці на рівні 55%, а у дослідженні Bharti et al. (2018) стерилізація із фунгіцидом забезпечувала приживлюваність листових експлантів томату на рівні 77%.

Загалом, проведені експерименти довели доцільність використання та високу ефективність дії фунгіцидних речовин при поверхневій стерилізації ініціальних експлантів дослідних рослин.

3.2. Застосування аскорбінової кислоти під час введення експлантів павловнії та ожини в культуру *in vitro*

Наступним етапом досліджень було визначення впливу додавання у середовище МС аскорбінової кислоти для зменшення оксидативного стресу висаджених ініціальних експлантів. В експериментах було випробувано широкий спектр концентрацій, що пов'язано із великою різноманітністю результатів, отриманих іншими дослідниками у подібних експериментах на мікроклонованих рослинах (Wu & du Toit 2004, Ishtiaq et al. 2013, Ndakidemi et al. 2014, Irshad et al. 2018).

Отримані результати свідчать про те, що лише три випробувані концентрації мали вплив на приживлюваність, проліферацію бруньок та кількість сформованих пагонів у павловнії (табл. 3.2.1).

Встановлено, що концентрації аскорбінової кислоти 1,0 мг/л, та 5,0 мг/л не показали статистично значущої різниці з контролем за жодним з аналізованих показників. У дослідних варіантах із додаванням кислоти у кількості 50,0 мг/л та 100,0 мг/л, реєстрували підвищення рівня приживлюваності на 11,7%, та 10,0%, відповідно. Проліферація відбувалася, в середньому, на 1,1 доби та 0,8 доби раніше за контроль у варіантах середовища МС з 50,0 мг/л та 100,0 мг/л аскорбінової кислоти. При цьому, аскорбінова кислота у зазначених концентраціях показала однаковий вплив, що статистично не відрізнявся.

Таблиця 3.2.1

Приживлюваність, проліферація та пагоноутворення ініціальних експлантів павловнії на середовищі МС з різними концентраціями аскорбінової кислоти

Концентрація аскорбінової кислоти, мг/л	Приживлюваність експлантів, %	Проліферація бруньок* (кількість діб від початку культивування)	Кількість сформованих пагонів на експлант
Контроль	56,7±2,9 ^{ab}	9,2±0,5 ^c	1,4±0,2 ^a
1,0	56,7±5,7 ^{ab}	9,1±0,5 ^{bc}	1,3±0,2 ^a
5,0	58,3±5,7 ^{ab}	9,2±0,4 ^c	1,4±0,3 ^a
10,0	63,3±2,9 ^{bc}	8,3±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a
50,0	68,3±2,9 ^c	8,1±0,2 ^a	1,3±0,2 ^a
100,0	66,7±5,7 ^c	8,4±0,6 ^{ab}	1,4±0,2 ^a
200,0	51,7±2,9 ^a	9,8±0,4 ^c	1,3±0,3 ^a

** Примітка – кращими вважались більш ранні строки початку проліферації.*

У концентрації 10,0 мг/л, впливу на приживлюваність експлантів павловнії виявлено не було, проте проліферація починалася на 0,9 доби раніше, ніж у контрольній групі, що було на рівні впливу концентрацій 50,0 мг/л та 100,0 мг/л. Варто також відмітити, що на кількість сформованих пагонів на експлантах павловнії додавання аскорбінової кислоти не показало статистично достовірного впливу.

На рис. 3.2.1 можна спостерігати візуальні відмінності у розвитку експлантів павловнії на 8-му та 14-ту добу культивування. Експланти, що вирощували на середовищі МС з 50,0 мг/л аскорбінової кислоти, мали насичений зелений колір, розвиток нових пагонів відбувався швидше (рис. 3.2.1А та 3.2.1С).

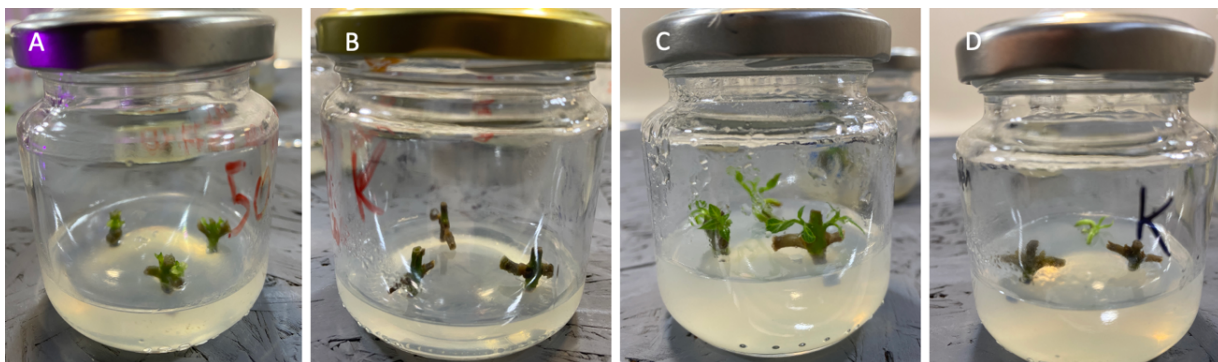


Рис. 3.2.1. Розвиток експлантів павловнії на середовищі МС на 8-у добу культивування: А) 50,0 мг/л аскорбінової кислоти; В) контроль та на 14-у добу культивування: С) 50,0 мг/л аскорбінової кислоти; D) контроль

У той самий час, більшість експлантів на контрольному середовищі змінили колір на бурий (рис. 3.2.1В), демонстрували затримку росту та формували пагони більш блілого зеленого кольору (рис. 3.2.1.D).

Таким чином, для первинних етапів мікроклонального розмноження павловнії можна використовувати додавання аскорбінової кислоти у середовище в концентраціях від 50,0 мг/л до 100,0 мг/л. Оскільки вплив цих концентрацій між собою статистично не відрізнявся, для покращення приживлюваності та пришвидшення проліферації бруньок економічно доцільніше використовувати концентрацію 50,0 мг/л.

Для експлантів ожини аскорбінова кислота в певних концентраціях також показала позитивний ефект (табл. 3.2.2).

За додавання від 1,0 до 10,0 мг/л аскорбінової кислоти статистично достовірних змін по жодному з аналізованих показників відмічено не було.

Вищу за контроль приживлюваність мали ті ініціальні експланти, що було висаджено на середовище із додаванням від 50,0 до 200,0 мг/л кислоти. При цьому, суттєвої різниці між впливом аскорбінової кислоти у цих концентраціях не реєстрували: приживлюваність підвищувалася на 6,6-11,6%.

Таблиця 3.2.2

Приживлюваність, проліферація та пагоноутворення ініціальних експлантів ожини на середовищі МС з різними концентраціями аскорбінової кислоти

Концентрація аскорбінової кислоти, мг/л	Приживлюваність експлантів, %	Проліферація бруньок* (кількість діб від початку культивування)	Кількість сформованих пагонів на експлант
0,0 (Контроль)	71,7±2,9 ^a	7,5±0,4 ^c	1,3±0,2 ^a
1,0	75,0±5,0 ^{ab}	7,4±0,3 ^c	1,4±0,2 ^a
5,0	73,3±2,9 ^{ab}	7,3±0,2 ^c	1,4±0,2 ^a
10,0	71,7±2,9 ^a	6,9±0,2 ^b	1,4±0,2 ^a
50,0	78,3±2,9 ^{bc}	6,5±0,2 ^{ab}	1,5±0,1 ^a
100,0	83,3±2,9 ^c	6,2±0,2 ^a	1,9±0,1 ^b
200,0	81,7±2,9 ^c	6,3±0,2 ^a	1,9±0,1 ^b

* Примітка – кращими вважались більш ранні строки початку проліферації.

За показником впливу на початок проліферації, випробувані концентрації чітко розподілилися на групи відповідно до збільшення кількості доданої кислоти: за додавання 1-5 мг/л, строки проліферації не відрізнялись від контрольного варіанту, 10,0-50,0 мг/л – проліферація прискорювалася на 0,6-1,0 добу, та за використання концентрацій 100,0-200,0 мг/л – строки зсувалися на 1,2-1,3 доби раніше (рис. 3.2.2).

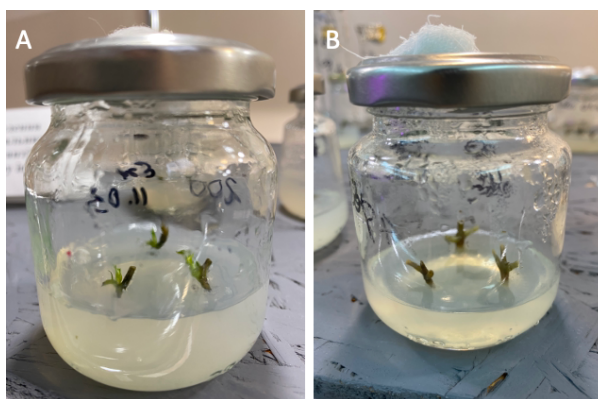


Рис. 3.2.2. Розвиток експлантів ожини на середовищі МС на 6-у добу культивування: А) 200,0 мг/л аскорбінової кислоти; В) контроль

На відміну від культури павловнії *in vitro*, додавання аскорбінової кислоти вплинуло також на кількість сформованих пагонів на експлантах ожини. За використання кислоти у концентраціях 100,0 та 200,0 мг/л середня кількість пагонів на один експлант становила на 0,6 пагонів більше, ніж на контрольному середовищі. При цьому відмінностей у ступені дії між двома згаданими концентраціями не відмічали.

Отже, з урахуванням усіх дослідних показників, для введення в культуру *in vitro* рослин ожини найбільш оптимальними визначили концентрації аскорбінової кислоти 100,0 та 200,0 мг/л, оскільки вони сприяли підвищенню приживлюваності, кількості утворених пагонів та прискоренню проліферації. Враховуючи те, що статистично достовірної різниці між впливом двох зазначених концентрацій виявлено не було, рекомендовано використовувати саме 100,0 мг/л для більшої економічності при підготовці середовищ для культивування.

Під час аналізу проведених дослідів було виявлено, що отримані результати найбільше відповідають дослідженням Ghatas (2016), що використовував аскорбінову кислоту у концентрації 100,0 мг/л як компонент антиоксидантного розчину для обробки експлантів перед висадкою. Це забезпечило нижчий ступінь некрозу, менший рівень побуріння середовища та більш насичений зелений колір експлантів, що ми також спостерігали у нашому досліді.

Таким чином, під час введення в культуру *in vitro* рослин Павловнії повстяної та Ожини звичайної для покращення приживлюваності, індукції множинної проліферації та пришвидшення проліферації бруньок доцільно додавати до середовища МС аскорбінову кислоту в концентраціях 50,0 мг/л для павловнії та 100,0 мг/л для ожини.

3.3. Вплив консистенції живильного середовища на розвиток експлантів дослідних рослин під час введення в культуру *in vitro*

В результаті подальшої роботи було встановлено, що на всі аналізовані показники при введенні павловнії в культуру *in vitro* впливала також і концентрація агару у середовищі (Титаренко та ін. 2020). Визначено позитивний

вплив напіврідкої консистенції середовища (0,4% агару) як на строки початку проліферації, так і на утворення множинних пагонів та приживлюваність експлантів павловнії *in vitro*.

На рис. 3.3.1А видно, що культивування експлантів на напіврідкому середовищі підвищило приживлюваність на 8,3% порівняно з твердим середовищем.

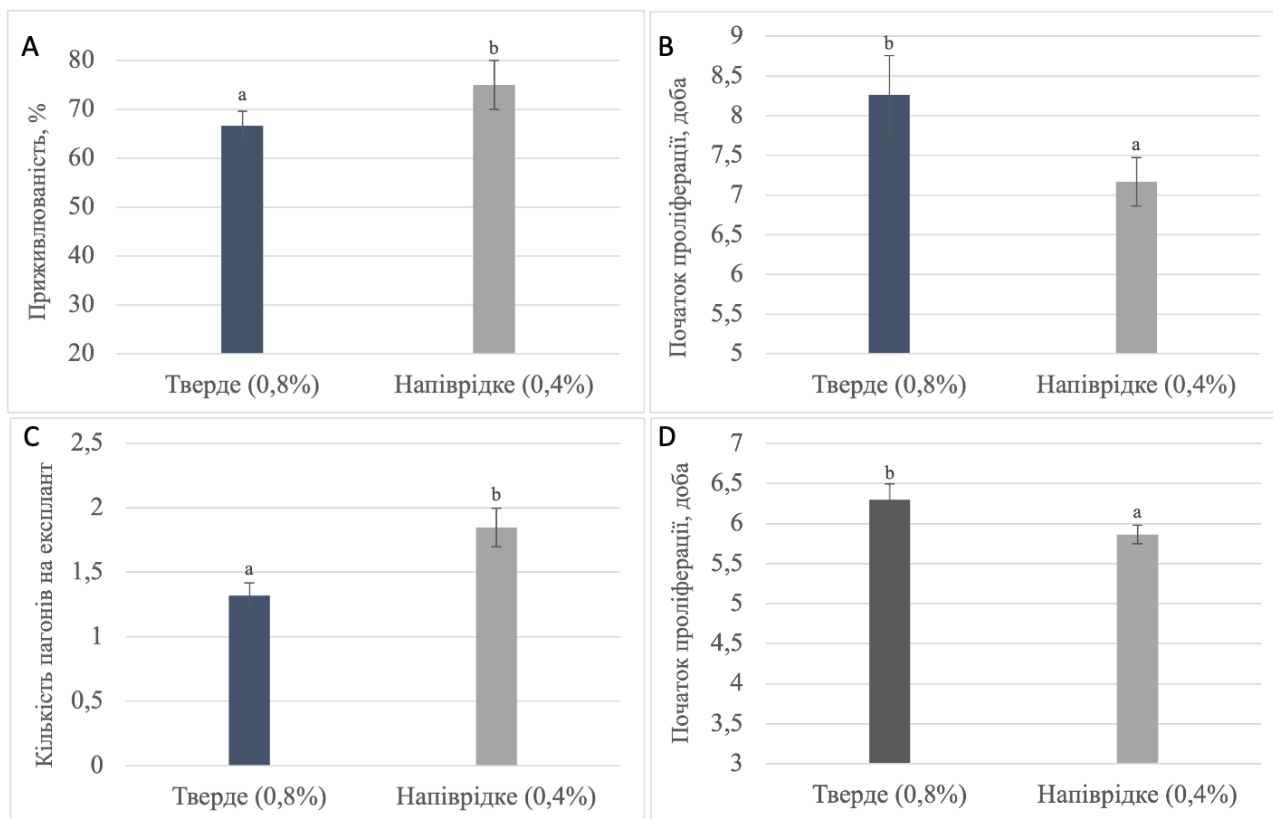


Рис. 3.3.1. Ріст та розвиток експлантів на середовищі МС з 0,4% та 0,8% агару: А – приживлюваність (%) експлантів павловнії; В – початок проліферації експлантів павловнії (кращими вважались більш ранні строки); С – кількість сформованих пагонів на експлант павловнії; Д – початок проліферації експлантів ожини

Окрім того, культивування на напіврідкому середовищі підвищувало і швидкість проліферації бруньок (рис. 3.3.1В).

У середньому, бруньки на експлантах павловнії починали проліферувати на 1,1 доби раніше на напіврідкому середовищі порівняно до твердого, що не тільки пришвидшувало процес мікроклонального розмноження, але і дозволяло

економити на витратах електроенергії для забезпечення сталих умов росту мікроклонованих рослин (Титаренко 2017).

Також, на відміну від попередніх модифікацій первинних етапів мікроклонування павловнії, зміна консистенції вплинула і на кількість сформованих пагонів на одному експланті (рис. 3.3.1C).

Якщо на твердому середовищі МС за час спостережень було зареєстровано, в середньому, $1,3 \pm 0,1$ пагонів на експлант, то на напіврідкому – $1,9 \pm 0,2$ пагонів. Індукція множинної проліферації значною мірою підвищувала коефіцієнт розмноження рослин, оскільки від одного експланта можна було отримати більше матеріалу для наступних пасажів.

Для рослин ожини, зміна концентрації агару у середовищі статистично достовірно позитивно вплинула тільки на початок проліферації експлантів (рис. 3.3.1D). На напіврідкому середовищі з 0,4% агару експланти починали проліферувати на 0,4 доби раніше, ніж на твердому.

Однак, у порівнянні із попередньою модифікацією, змін рівня приживлюваності чи кількості сформованих пагонів або вузлів у ожини із зниженням концентрації агару відмічено не було.

Загалом, наші дослідження показали кращий ріст експлантів павловнії на напіврідкому середовищі МС із 0,4% агару під час введення в культуру *in vitro* за всіма показниками, в ожини – за показником початку проліферації. Можливо, це відбувалось завдяки кращій аерації експлантів, що знаходилися в середовищі у напівзануреному стані. Більша площа живлення створювала належні умови для росту та розвитку експлантів. Також, фенолоподібні речовини, які все одно могли виділятися пошкодженими рослинними тканинами, незважаючи на обробку антиоксидантами, ймовірно, краще поглиналися та розподілялися углиб маси середовища, не концентруючись безпосередньо біля експланта, як це відбувалось на твердому середовищі. Тобто, завдяки напіврідкій консистенції середовища спостерігалось додаткове полегшення оксидативного стресу.

У подібних дослідях Matos et al. (2020) використання напіврідкого середовища спричиняло зростання сухої та свіжої маси коренів та пагонів

мікроклонів, а також коефіцієнту розмноження. У роботі Alkhateeb & Alturki (2014) також відмічали підвищення сухої та свіжої маси рослин при вирощуванні на середовищі зі зниженою концентрацією агару. У інших експериментах (Abdollahi et al. 2016), концентрація агару впливала на індукцію калусогенезу у експлантів огірка *Cucumis sativus* L., але результати були різними у залежності від сорту рослини.

Отже, наші результати є важливим доповненням досвіду застосування середовищ зі зниженою концентрацією желуючого агенту та демонструють перевагу використання напіврідкого живильного середовища МС із 0,4% агару для початкових етапів мікроклонального розмноження павловнії та ожини.

3.4. Застосування альтернативних желуючих компонентів на етапі введення павловнії та ожини в культуру *in vitro*

Кукурудзяний крохмаль (КК) та гуарова камедь (ГК) були випробувані під час первинних етапів мікроклонування дослідних рослин із замірами приживлюваності, початку проліферації та кількості сформованих вузлів та пагонів на експлант.

Для рослин павловнії, приживлюваність була найвищою за використання КК як желуючого агенту – $80,0 \pm 5,0\%$ (рис. 3.4.1А).

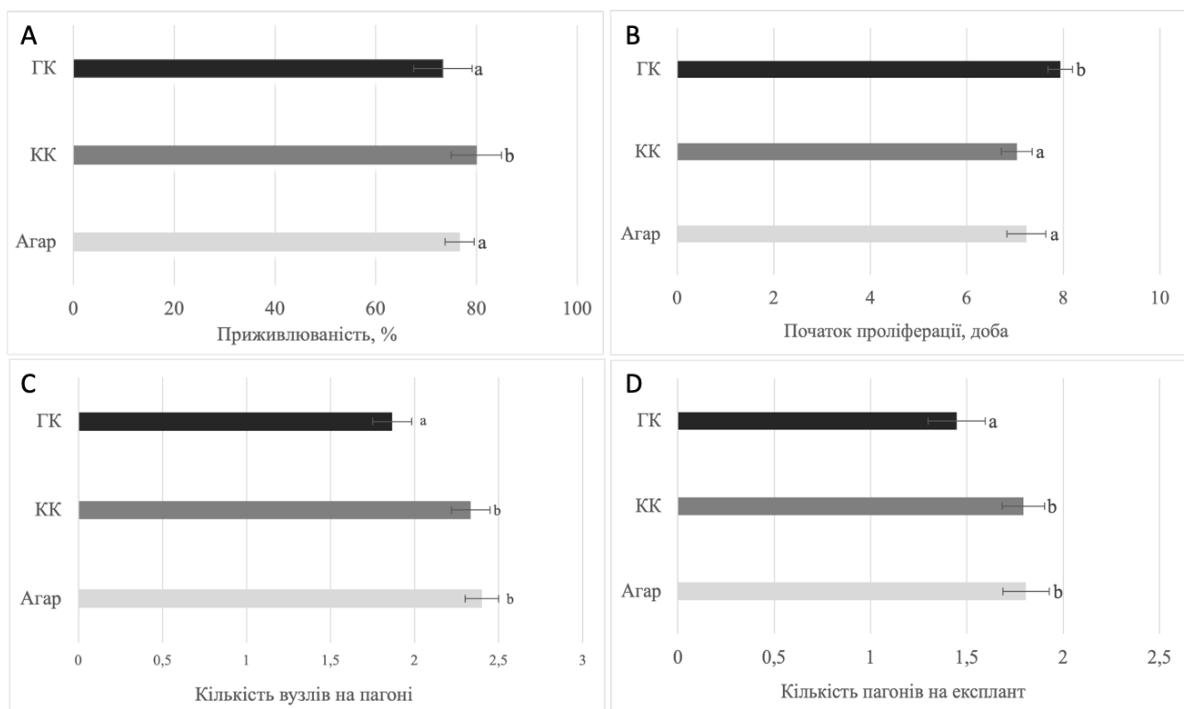


Рис. 3.4.1. Ріст та розвиток експлантів павловнії *in vitro* на середовищі МС з різними желюючими агентами (3% гуарової камеді (ГК), 7% кукурудзяного крохмалю (КК), 0,4% агару): А – приживлюваність (%); В – початок проліферації (кращими вважались більш ранні строки); С – кількість сформованих вузлів на пагін; D – кількість сформованих пагонів на експлант

Значення цього показника були дещо нижчими та знаходилися на одному рівні за додавання до середовища агару або ГК – $76,7 \pm 2,9\%$ та $73,3 \pm 5,8\%$ відповідно.

Спостерігали також і вплив желюючого агенту на строки проліферації експлантів павловнії (рис. 3.4.1В).

За використання ГК, відмітили затримку початку проліферації на 0,7-0,9 дні порівняно до інших варіантів середовища. За додавання КК чи агару, експланти павловнії проліферували найшвидше – на 7,0-7,2 добу від моменту висадки на середовище.

Також використання різних желюючих агентів відобразилося на кількості сформованих вузлів на новоутворених пагонах павловнії (рис. 3.4.1С).

За використання ГК спостерігали зменшення кількості вузлів на 0,5 вузли у порівнянні з культивуванням на агаризованому середовищі. КК у цьому випадку не продемонстрував статистично значущої різниці з агаром.

За показником кількості сформованих пагонів на експлант середовище із ГК знов показало пригнічення росту – рослини на ньому формували на 0,4 пагони менше за інші варіанти (рис. 3.4.1D).

У свою чергу, на середовищах із агаром та КК кількість сформованих пагонів була однаковою та найвищою в експерименті – $1,8 \pm 0,1$ пагонів на експлант.

На первинних етапах розмноження ожини також виявлені певні відмінності у рівні приживлюваності експлантів на середовищах із різними желюючими агентами (рис. 3.4.2А).

За використання ГК приживлюваність була суттєво нижчою, ніж на середовищах з агаром чи КК – на 16,7% та 13,4%, відповідно. При цьому статистично достовірної різниці між двома останніми варіантами желуючих агентів не виявлено.

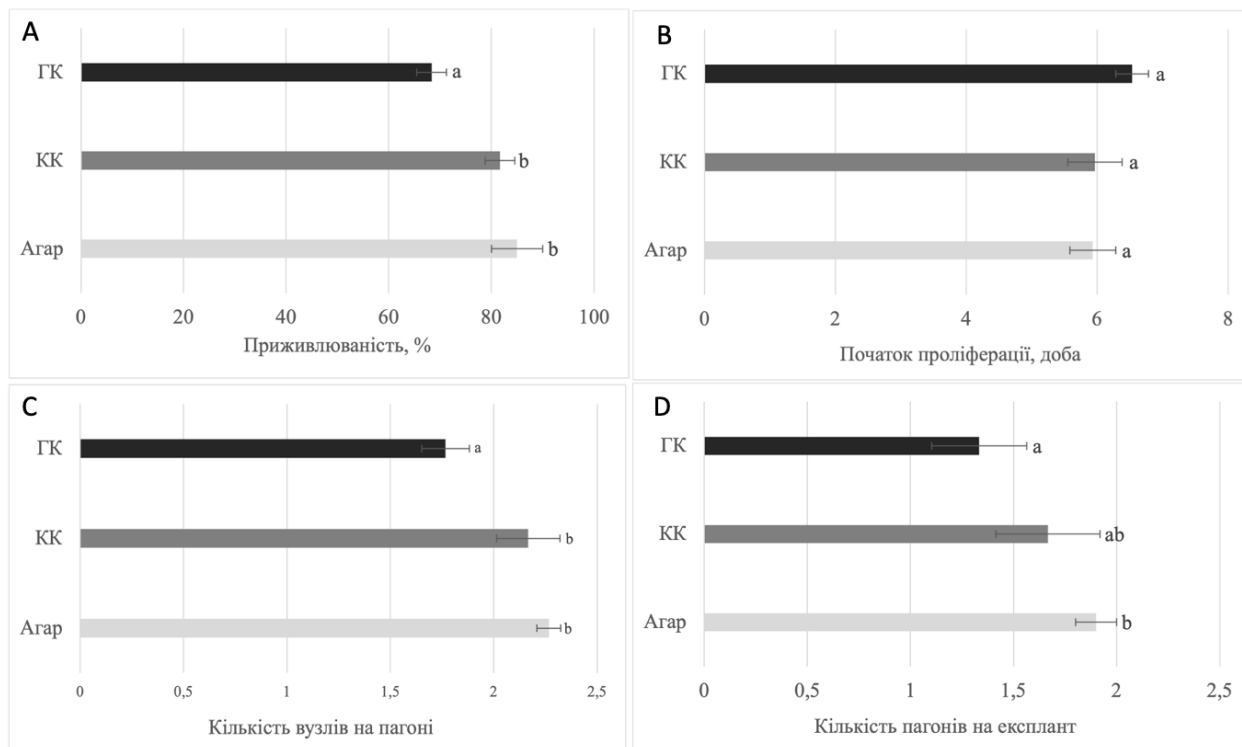


Рис. 3.4.2. Ріст та розвиток експлантів ожини *in vitro* на середовищі МС з різними желуючими агентами (3% гуарової камеді (ГК), 7% кукурудзяного крохмалю (КК), 0,4% агару): А – приживлюваність (%); В – початок проліферації (кращими вважались більш ранні строки); С – кількість сформованих вузлів на пагін; Д – кількість сформованих пагонів на експлант

Аналіз строків початку проліферації не показав статистично достовірних відмінностей між експлантами на усіх дослідних середовищах (рис. 3.4.2В).

У мікроклонів, що культивували на середовищі МС із ГК, проліферація, у середньому, відбувалася на 0,5 діб пізніше, але ця різниця виявилася статистично незначущою. Таким чином, було встановлено, що на проліферацію бруньок усі випробувані желуючі агенти впливали однаково.

Було відмічено різницю між впливом желуючих агентів на формування вузлів на пагонах ожини (рис. 3.4.2С). За використання агару та КК кількість

вузлів статистично не відрізнялася та була найбільшою в експерименті. Із ГК у ролі желуючого агенту, середня кількість вузлів знижувалася до $1,8 \pm 0,1$ вузла на пагін.

Під час введення в культуру *in vitro* рослин ожини також було виявлено залежність кількості сформованих пагонів на експланті від типу використаного желуючого агенту (рис. 3.4.2D).

Найменшу кількість пагонів формували рослини на середовищі МС із додаванням ГК – $1,3 \pm 0,2$ пагонів на експлант. Найбільшу кількість пагонів утворювали експланти, культивовані на агаризованому середовищі – $1,9 \pm 0,1$ пагонів. За використання КК кількість сформованих пагонів була проміжною, та статистично не відрізнялася від двох інших варіантів середовищ – $1,7 \pm 0,3$ пагонів.

Отже, ГК у концентрації 3% не рекомендована як альтернативний желуючий компонент середовища МС для введення в культуру експлантів ожини і павловнії, оскільки за її використання було виявлено затримку росту експлантів порівняно з агаризованим середовищем. КК у концентрації 7% доцільно використовувати з даною метою, оскільки за його використання не було виявлено негативного впливу на біометричні показники дослідних рослин, а для експлантів павловнії було встановлено статистично достовірно вищий рівень приживлюваності на середовищі з КК, ніж на агаризованому.

3.5. Оптимізація фітогормонального складу живильного середовища на етапі стерильного живцювання дослідних рослин

На етапі удосконалення стадії стерильного живцювання зміни у якісному та кількісному складі фітогормонів у середовищі МС показали суттєвий вплив на приріст мікроклонів протягом одного циклу культивування.

Встановлено, що під час мікроклонального розмноження павловнії, вирощування живців на безгормональному середовищі призводило до отримання мікроклонів з найменшою висотою, кількістю вузлів та сформованих пагонів (табл. 3.5.1).

Морфометричні показники живців павловнії на середовищі МС із різними концентраціями фітогормонів

Концентрація фітогормонів, мг/л	Середня висота мікроклона, см	Середня кількість вузлів на пагоні	Середня кількість сформованих пагонів на живці
МС без фітогормонів (контроль)	2,5±0,2 ^a	2,2±0,4 ^a	1,3±0,2 ^a
1,0 БАП+0,25 НОК	3,2±0,2 ^b	2,7±0,2 ^b	1,6±0,2 ^b
1,5 БАП+0,5 НОК	3,2±0,1 ^b	2,9±0,1 ^{bc}	1,8±0,1 ^{bcd}
2,0 БАП+0,5 НОК	3,6±0,2 ^{cd}	3,0±0,21 ^{bcd}	1,9±0,1 ^{cd}
1,0 БАП+0,25 ІОК	3,3±0,2 ^{bc}	2,8±0,2 ^b	1,7±0,1 ^{bc}
1,5 БАП+0,5 ІОК	3,8±0,1 ^{de}	3,2±0,1 ^{cd}	1,9±0,1 ^{cd}
2,0 БАП+0,5 ІОК	4,1±0,2 ^e	3,3±0,2 ^d	2,0±0,1 ^d

Із додаванням фітогормонів ці показники підвищувалися. За зростання концентрації БАП спостерігали підвищення як висоти, так і кількості вузлів та сформованих пагонів мікроклонів. При цьому тип та кількість використаного ауксину також впливали на аналізовані показники: наприклад, середня висота мікроклонів була більшою за використання ІОК, ніж НОК в однакових концентраціях. Проте, такої залежності у кількості сформованих вузлів та пагонів не спостерігали.

У результаті, виявлено, що найоптимальнішим співвідношенням фітогормонів для стерильного живцювання павловнії у рамках наших досліджень виявилось 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК на літр середовища.

У роботах інших дослідників щодо встановлення найбільш ефективної концентрації фітогормонів у живильному середовищі для росту рослин роду *Paulownia* результати були дуже різноманітними. Наприклад, у дослідженні

Chunchukov & Yancheva (2015) для успішного процесу мікроклонування різних гібридів павловнії найкращим виявилось співвідношення 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК. В експериментах Ghatas et al. (2016), використання 2 мг/л БАП значно покращувало проліферацію експлантів, а кращу довжину пагонів забезпечувало додавання одного мг/л ІМК. У роботі Abou El-ghait et al. (2022) найбільша довжина пагонів спостерігалася за додавання у середовище 2 мг/л БАП, а також кінетину у концентрації 3 мг/л. У експериментах Magar et al. (2016), найефективнішою знову виявилася концентрація БАП 2 мг/л, але використання НОК було визначене як більш оптимальне у порівнянні з ІОК (0,1 мг/л), оскільки бажаних біометричних параметрів мікроклони досягали швидше саме за використання НОК. При цьому, у дослідженнях Mohamad et al. (2022), ефективним визначили додавання 10 мг/л БАП, а використання 0,5 мг/мл ІМК було відмічене як більш прийнятне за НОК.

Таким чином, велика різноманітність наукових даних може свідчити про видову специфічність особливостей вирощування павловнії шляхом мікроклонування. При цьому використання фітогормону БАП у концентрації 2 мг/л найчастіше серед усіх цитокінінів демонструвало позитивний ефект на висоту пагонів та кількість вузлів, а концентрації та тип використаних ауксинів був дуже різноманітним та міг залежати як від генотипу вихідної рослини, так і, можливо, від виробника речовин фітогормональної дії.

Під час мікроклонування ожини варіанти середовищ із фітогормонами також виявилися більш ефективними у порівнянні з контролем (табл. 3.5.2).

У даному випадку середня висота мікроклонів також зростала із збільшенням концентрацій регуляторів росту, але за використання 1,5 мг/л БАП і більше, значення цього показника залишалися статистично однорідними незалежно від типу використаного ауксину. Статистично достовірної різниці впливу дослідних співвідношень фітогормонів на кількість сформованих пагонів виявлено не було. Проте, була виявлена різниця у впливі середовищ із різними типами ауксинів на кількість сформованих вузлів: у ожини їх було більше за використання 0,5 мг/л НОК, а не ІОК. При цьому кількість вузлів залишалась на

одному рівні за комбінації НОК як з 1,5 мг/л, так і 2,0 мг/л БАП. Саме тому, найбільш оптимальним та економічним співвідношенням фітогормонів для культивування мікроклонів ожини було визначено варіант середовища МС з 1,5 мг/л БАП+0,5 мг/л НОК.

Таблиця 3.5.2

Морфометричні показники живців ожини на середовищі МС із різними концентраціями фітогормонів

Концентрація фітогормонів, мг/л	Середня висота мікроклона, см	Середня кількість вузлів на пагоні	Середня кількість сформованих пагонів на живці
МС без фітогормонів (контроль)	1,8±0,3 ^a	1,5±0,3 ^a	1,5±0,3 ^a
1,0 БАП+0,25 НОК	2,9±0,1 ^{bc}	2,6±0,2 ^c	1,8±0,1 ^b
1,5 БАП+0,5 НОК	3,4±0,2 ^e	3,0±0,2 ^d	2,0±0,1 ^b
2,0 БАП+0,5 НОК	3,4±0,3 ^{de}	3,1±0,3 ^d	1,9±0,1 ^b
1,0 БАП+0,25 ІОК	2,6±0,2 ^b	2,0±0,1 ^b	1,8±0,1 ^b
1,5 БАП+0,5 ІОК	3,0±0,3 ^{cd}	2,5±0,3 ^c	1,9±0,1 ^b
2,0 БАП+0,5 ІОК	3,1±0,2 ^{cde}	2,6±0,2 ^c	1,9±0,1 ^b

Загалом, наші результати співвідносяться із іншими дослідженнями оптимального фітогормонального складу живильного середовища для вирощування ожини різних сортів. Наприклад, для сорту «Triple Crown» (Abdalla et al. 2015) найефективнішою була концентрація БАП 2,0 мг/л, а також НОК – 0,1 мг/л. Для успішного розмноження ожини сорту «Karak Black» ефективним було застосування БАП у концентрації 0,4 мг/л, разом із 5,0 мг/л кінетина та 0,1 мг/л

тідіазурону (Samaan et al. 2022). Для сорту «Prime-ark 45» було встановлено оптимальну концентрацію БАП на рівні 1,0 мг/л, а НУК – 0,01 мг/л (Abdrabboh et al. 2021). Для найбільш успішного розмноження рослин сорту «Agavam», було визначено додавати у середовище БАП у концентрації 1 мг/л, та ІМК 0,05 мг/л (Lepse & Laugale 2009).

Таким чином, наші результати підтвердили ефективність додавання БАП до середовища у концентраціях 1-2 мг/л для культивування різних сортів ожини, а також виявлено необхідність здійснювати підбір ауксину експериментальним шляхом для кожного сорту окремо. Як і у випадку із павловнією, необхідні концентрації регуляторів росту можуть також залежати і від рівня хімічної чистоти цих речовин, тобто безпосередньо від виробника.

3.6. Використання різних желюючих компонентів на етапах стерильного живцювання та укорінення дослідних рослин

Під час культивування живців павловнії не було відмічено різниці середньої висоти мікроклонів за використання у ролі желюючих агентів агару, КК чи ГК (табл. 3.6.1).

Таблиця 3.6.1

Середня висота, кількість сформованих вузлів та пагонів у живців павловнії на середовищах МС із різними желюючими агентами

Середовище	Середня висота, см	Середня кількість вузлів на пагоні	Середня кількість сформованих пагонів на живці
МС із 0,8% агару (контроль)	4,0±0,3 ^a	3,3±0,1 ^b	2,0±0,1 ^b
МС із 7% кукурудзяного крохмалю	4,0±0,3 ^a	3,5±0,2 ^b	1,9±0,1 ^{ab}
МС із 3% гуарової камеді	3,6±0,2 ^a	2,8±0,2 ^a	1,8±0,1 ^a

Однак, за показниками кількості вузлів та пагонів живців, що культивувались на МС із додаванням ГК, утворювали на 0,7 вузлів та 0,5 пагонів менше, ніж мікроклони на агаризованому середовищі. Середовища із КК та агаром продемонстрували статистично одноманітні результати.

Враховуючи всі проаналізовані показники, ГК (3%) не може бути рекомендована як желуючий агент для стерильного живцювання павловнії, оскільки на такому середовищі спостерігали пригнічення утворення вузлів та пагонів мікроклонів у порівнянні з агаризованим. Використання КК 7% не дало значного збільшення аналізованих показників, але і не вплинуло негативно. З огляду на більшу економічність крохмалю, його можна рекомендувати як альтернативний желуючий агент для здешевлення біотехнологічного процесу.

На рис. 3.6.1 наведено результати аналізу коренеутворення мікроклонів, що укорінювали на середовищі МС протягом двох тижнів перед адаптацією.

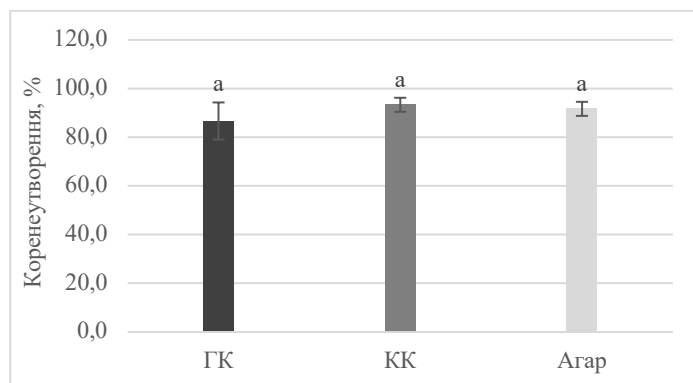


Рис. 3.6.1. Коренеутворення (%) експлантів павловнії *in vitro* за різних типів желуючого агента в середовищі МС (для укорінення): 3% гуарової камеді (ГК), 7% кукурудзяного крохмалю (КК), 0,8% агару (Контроль)

При цьому на усіх варіантах середовища рівень коренеутворення знаходився на одному рівні. Отже, для етапу укорінення експлантів павловнії можливо використовувати усі дослідні желуючі агенти.

За мікроклонального розмноження ожини спостерігали схожі тенденції (табл. 3.6.2).

Під час культивування живці на середовищах МС із додаванням агару та КК показали статистично одноманітні результати як за середньою висотою, так і за

кількістю вузлів та пагонів. При цьому на середовищі із вмістом ГК мікроклони росли повільніше, що відобразилось у зменшенні висоти на 0,6-0,7 см, та кількості вузлів – на 0,5-0,6 вузлів.

Таблиця 3.6.2

Середня висота, кількість сформованих вузлів та пагонів у живців ожини на середовищах МС із різними желуючими агентами

Середовище	Середня висота, см	Середня кількість вузлів на пагоні	Середня кількість сформованих пагонів на живці
МС із 0,8% агару (контроль)	$3,4 \pm 0,2^b$	$3,0 \pm 0,2^b$	$1,9 \pm 0,1^a$
МС із 7% кукурудзяного крохмалю	$3,3 \pm 0,2^b$	$2,9 \pm 0,1^b$	$1,9 \pm 0,2^a$
МС із 3% гуарової камеді	$2,7 \pm 0,2^a$	$2,4 \pm 0,2^a$	$1,7 \pm 0,1^a$

Таким чином, на стадії мікроклонування ожини також допустимо використовувати КК як більш економічну альтернативу агару.

В експерименті із укоріненням мікроклонованих рослин ожини *in vitro*, відсоток укорінених мікроклонів змінювався у залежності від використаного желуючого агенту (рис. 3.6.2).

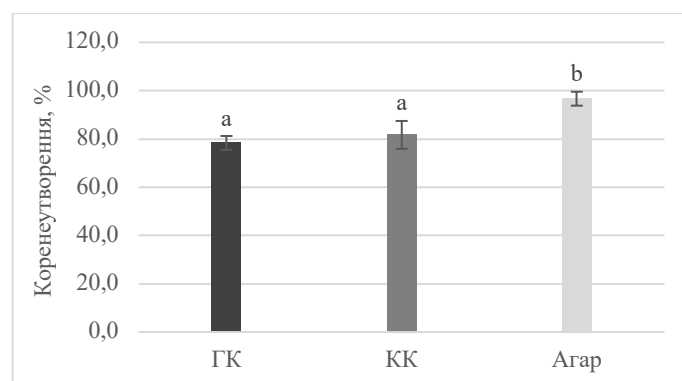


Рис. 3.6.2. Коренеутворення (%) експлантів ожини *in vitro* за різних типів желюючого агенту в середовищі МС (для укорінення): 3% гуарової камеді (ГК), 7% кукурудзяного крохмалю (КК), 0,8% агару (Контроль)

При цьому найбільший відсоток коренеутворення спостерігали саме на агаризованому середовищі – $96,7 \pm 2,9\%$, а з використанням інших желюючих агентів був суттєво нижчим – на 15% із КК та на 18,4% із ГК.

Тому у даному випадку для коренеутворення мікроклонів ожини в рамках цього дослідження може бути рекомендоване тільки агаризоване середовище.

З експериментів інших дослідників щодо можливостей використання альтернативних желюючих агентів відомо про позитивний досвід застосування як крохмалів, так і ГК. Але результати були дуже різноманітними та залежали від виду культивованих рослин. Наприклад, коренеутворення *Crataeva nurvala* покращувалося за вирощування на середовищі із ГК порівняно до агару (Babbar et al. 2004), а Mahallesı & Sokak (2016) визначили однаковий ріст та розвиток експлантів картоплі на середовищах із агаром та ГК, проте за використання ГК мікроклонування було найбільш економічно вигідним. В експериментах Amlesom et al. (2021) визначали ефект різних типів крохмалю як желюючих агентів на експланти картоплі, та виявлено, що усі вони забезпечують покращення біометричних параметрів мікроклонів у порівнянні з агаризованим середовищем. У свою чергу, Fira et al. (2013) досліджували культивування *Amelanchier canadensis* із широким діапазоном желюючих агентів – у тому числі, крохмалем та ГК. У даному випадку найбільшу кількість пагонів формували експланти на середовищі із ГК, але найбільшу висоту мали мікроклони, вирощувані на середовищі із крохмалем. Саме крохмаль у цьому дослідженні, з огляду на всі аналізовані параметри та економічність (скорочення витрат на 75,6% у порівнянні з агаризованим середовищем), було визнано найкращим желюючим агентом для зазначеного виду рослин.

Желюючі агенти по-різному впливають на різноманітні культури рослин, тому доцільність використання у кожному випадку повинна вирішуватися

експериментально. У цілому, така практика є виправданою, особливо, з метою скорочення витрат на виробництво садивного матеріалу.

Проведені дослідження дозволили встановити, що ГК у концентрації 3% не рекомендовано використовувати для мікроклонального розмноження рослин павловнії та ожини сорту Торнфрі, оскільки на такому середовищі спостерігається погіршення росту та розвитку експлантів, що проявляється у зменшенні висоти, кількості сформованих пагонів та вузлів, нижчому рівні приживлюваності. КК у концентрації 7%, у свою чергу, можна використовувати як альтернативний желуючий агент середовища МС без негативного впливу на вищезазначені показники. Враховуючи значно нижчу вартість КК порівняно до агару, його використання рекомендовано для удосконалення біотехнології розмноження дослідних рослин.

РОЗДІЛ 4. ВІДБІР АНТАГОНІСТИЧНИХ БАКТЕРІЙ З РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

4.1. Визначення антагоністичних властивостей дослідних бактерій до міцеліальних грибів

Для відбору антагоністично активних бактерій було вивчено ступінь їх антагоністичної активності щодо міцеліальних грибів, які в першу чергу призводять до загибелі мікроклонів у процесі адаптації до умов відкритого ґрунту.

Антагоністична активність *E. italicus* ONU547. Було встановлено, що бактерії *E. italicus* ONU547 виявили антагоністичні властивості до 7 тест-штамів міцеліальних грибів (табл. 4.1.1).

Таблиця 4.1.1

Антагоністична активність *E. italicus* ONU547 щодо міцеліальних грибів

Штам гриба	Середній діаметр зони затримки росту, мм
<i>A. tenuissima</i> ONU F-24	14,7±1,2
<i>R. cerealis</i> ONU F-30	14,0±0,1
<i>F. oxysporum</i> F-54201	0,0±0,0
<i>C. cladosporioides</i> F-2235	18,7±1,2
<i>P. variotii</i> F-424	14,7±1,2
<i>P. expansum</i> F-575	14,0±0,0*
<i>A. alternata</i> F-16866	16,7±1,2
<i>A. niger</i> F-16706	19,3±1,2

*Примітка - спостерігали не затримку росту, але затримку спороношення гриба; показано середні діаметри (у мм) зон затримки росту грибів±стандартні відхилення.

Найбільші зони затримки росту спостерігали під час експозиції з *A. niger* (діаметр зони – 19,3±1,2 мм), *C. cladosporioides* (18,7±1,2 мм), та *A. alternata* (16,7±1,2 мм). Антагоністична активність щодо *A. tenuissima*, *R. cerealis*,

P. variotii також була відмічена, з середньою зоною затримки росту – 14,0-14,7 мм. У свою чергу, антагонізм до *P. expansum* спостерігали як затримку спороношення, а не затримку росту міцелію. Антагоністичних властивостей *E. italicus* ONU547 до *F. oxysporum* виявлено не було.

Наші результати співвідносяться з роботами інших дослідників по виявленню антагоністичних властивостей інших штамів ентерококів (Kumar et al. 2016; Maany et al. 2019; Diaz et al. 2021). Нами не було знайдено попередніх досліджень щодо виявлення антагонізму *Enterococcus* spp. щодо *P. variotii*, *R. cerealis*, *A. tenuissima* та *C. cladosporioides*, але інші досліджувані види грибів *A. niger*, *A. alternata*, та *P. expansum* вже були відомі як сприйнятливі до антагоністичної дії ентерококів (Fhoula et al. 2013; Ben Braïek et al. 2018; David & Onifade 2018; Zabouri et al. 2021). Подібні антагоністичні властивості були підтверджені у наших експериментах.

До деяких фітопатогенних грибів *E. italicus* ONU547, на відміну від інших споріднених штамів (Ben Braïek et al. 2018; Kalantari et al. 2019; Houicher et al. 2021), не показав антагоністичної активності у жодному випадку, наприклад, до *F. oxysporum*. Також дослідні бактерії не затримували ріст міцелію *P. expansum*, але викликали затримку спороношення за сумісного культивування. Пригнічення споруляції може потенціально сповільнювати розвиток грибкових інфекцій у рослин, оскільки це впливає на розповсюдження спор, що є ключовим моментом у поширенні збудника інфекції (Dahlberg & Van Etten 1982).

У попередніх дослідженнях *in vivo* (Merlich et al. 2017a) було встановлено, що бактерії штаму *E. italicus* ONU547 також здатні пригнічувати ріст *Rhizobium radiobacter* C58 та *Erwinia carotovora* ZM1 на експлантах моркви на 33,3% та 24,8%, відповідно, тобто мікроорганізми досліджуваного штаму володіли антагоністичним потенціалом не тільки щодо грибів, але і фітопатогенних бактерій.

Антагоністична активність бактерій роду Bacillus. Бактерії дослідних штамів роду *Bacillus* виявили антагоністичні властивості до всіх представлених в експерименті міцеліальних грибів (табл. 4.1.2).

Антагоністична активність бактерій роду *Bacillus* до міцеліальних грибів

Штам гриба	<i>B. megaterium</i> ONU500	<i>B. velezensis</i> ONU553	<i>B. pumilus</i> ONU554	<i>B. subtilis</i> ONU559
<i>A. tenuissima</i> ONU F-24	10,3±0,6	32,3±2,5	28,67±1,2	18,7±1,2
<i>R. cerealis</i> ONU F-30	28,3±0,6	42,0±1,0	0,00±0,0	27,3±0,6
<i>F. oxysporum</i> F-54201	15,7±1,2	35,0±1,0	32,67±0,6	17,7±0,6
<i>C. cladosporioides</i> F-2235	17,0±1,0	22,7±0,6	21,67±0,6	0,0±0,0
<i>P. variotii</i> F-424	30,3±0,6	18,0±0,0	18,67±1,2	20,7±1,2
<i>P. expansum</i> F-575	22,7±1,2	24,7±0,6	10,33±0,6	0,0±0,0
<i>A. alternata</i> F-16866	0,0±0,0	29,7±0,6	22,33±0,6	32,7±0,6
<i>A. niger</i> F-16706	23,0±0,0	34,7±0,6	17,67±0,6	0,0±0,0

*Примітка – показано середні діаметри (у мм) зон затримки росту грибів±стандартні відхилення.

Найбільші зони затримки росту та антагонізм до усіх дослідних штамів грибів показали бактерії штаму *B. velezensis* ONU553, у той час як *B. megaterium* ONU500 та *B. pumilus* ONU554 виявили антагоністичну активність до всіх фітопатогенів у досліді, окрім *A. alternata* та *R. cerealis*, відповідно. *B. subtilis* ONU559 не виявив антагонізму до *C. cladosporioides* та *A. niger*, але володів активністю щодо усіх інших грибів у експерименті.

Отримані результати співвідносяться із даними сучасних досліджень щодо антагоністичних властивостей споріднених штамів бацил. Наприклад, бактерії різних штамів перелічених видів роду *Bacillus* демонстрували антагонізм до *Alternaria alternata* (Gorai et al. 2021), *Phytophthora infestans* (Wang et al. 2020), *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* (Hamaoka et al. 2021), *Colletotrichum scovillei* (Shin et al. 2021), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* (Teixeira et al. 2021; Hussain et al. 2021), *Phytophthora sojae* (Han et al. 2021), *Fusarium solani*, *Pythium* sp. (Abd-El-Kareem et al. 2021), *Fusarium oxysporum* (Putri et al. 2021; Samaras et al. 2021).

У попередніх дослідженнях було також проаналізовано геноми штамів *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 та *B. subtilis* ONU559, та виявлено кластери у геномах, що можуть бути відповідальними за синтез антибактеріальних та протигрибкових сполук (Штеніков та ін. 2020). Для штаму *B. velezensis* ONU553 встановлено кластери, що з 90-100% подібністю до вже відомих послідовностей кодують сурфактин, бацилін, фенгіцин, макролактин, бацилізин, бацилібактин, діфіцидин. Виявлено також декілька послідовностей (нерибосомна пептидсинтетаза, полікетидсинтетаза 3 типу, ферменти синтезу терпеноїдів), що не мали гомологів у базах даних (Shtenikov et al. 2020). Для штаму *B. pumilus* ONU554 також виявлені кластери, що потенційно можуть забезпечувати синтез антимікробних речовин: нерибосомні пептидсинтетази, полікетидсинтетази 1 та 3 типів, бактеріюцини, проте ступінь подібності цих кластерів до вже відомих була невисокою. Також у геномі цього штаму знайдені ділянки, відповідальні за синтез біотерпеноїдів та сидерофорів, що може виступати додатковим фактором стимуляції росту рослин (Штеніков та ін. 2020). Для штаму *B. subtilis* ONU559 визначили присутність кластерів з 100% ступенем подібності до вже відомих субтиломіцина, бацилена, фенгіцина, бацилізіна, субтилозіна А та бацилібактина. Також виявлено послідовність нерибосомної пептидсинтетази з подібністю 82% до сурфактина. Визначено і присутність полікетидсинтетази 3 типу та ферментів біосинтезу терпеноїдів, не схожих на вже відомі послідовності (Іваниця та ін. 2021).

Метаболомний аналіз бактерій вищезазначених штамів підтвердив наявність функціонуючих кластерів сурфактинів та фенгіцинів, і дозволив встановити наявність у *B. velezensis* ONU553 та *B. subtilis* ONU559 здатності до синтезу Аграстатину А – антифунгального агента, активного проти багатьох фітопатогенів. Також у бактерій цих штамів виявлено метаболіти із невідомими функціями (Ostapchuk et al. 2020).

Для *B. megaterium* ONU500 на сьогодні ще не проведено молекулярно-генетичних досліджень, проте за допомогою інших методів було встановлено, що бактерії цього штаму проявляли антагоністичні властивості до *Agrobacterium*

spp. (Защинська, 2019). Наші дослідження доповнюють та розширюють наявні дані щодо рістстимулювальних та захисних функцій цих бактерій, а також дозволяють визначити доцільність їх використання на етапі адаптації мікроклонованих рослин.

Антагоністична активність ізолятів актинобактерій. У результаті проведених експериментів встановлено, що досліджувані ізоляти актинобактерій виявили антагоністичні властивості до всіх тест-штамів міцеліальних грибів.

Активність різних ізолятів актинобактерій відрізнялася залежно від середовища, на якому вирощували актинобактерії (табл. 4.1.3 і табл. 4.1.4).

На всіх трьох випробуваних середовищах антагонізм до *A. tenuissima* показали ізоляти Conc2, Conc11, Myt4b, Conc 10, Conc 1, на двох середовищах – Conc18, Myt7ch, Conc4, Conc32, Conc42, Sea2, на одному – Myt7b, Myt8, Conc24, Lim4, Ku8, Conc9. Актинобактерії інших ізолятів не виявили антагоністичної активності щодо цього гриба на жодному із середовищ.

Антагоністичні властивості до *R. cerealis* на Гаузе 1, Гаузе 2 та вівсяному агарі продемонстрували ізоляти Conc11, Myt7ch, Conc32, Lim4, Lim6.1, Conc10, на двох середовищах – Conc2, Conc42, Myt8, Conc24, Conc9, на одному Conc5, Conc18, Myt7b, Myt5, Myt4b, Conc4, Conc8. Інші ізоляти не показали антагонізму.

До *F. oxysporum* антагоністичну активність на усіх дослідних середовищах виявили актинобактерії Conc32 та Myt8, на двох – Conc2, Conc11, Myt5, Myt4b, Myt7ch, Conc4, Conc24, Lim4, Conc10, на одному – Conc5, Conc42, Lim6.1, Conc1, Conc9. Інші ізоляти не показали активності.

Антагоністичні властивості до *C. cladosporioides* на трьох середовищах мали ізоляти Conc18, Myt7b, Myt5, Myt7ch, Conc4, Conc32, Conc24, Lim 4, на двох – Conc11, Myt4b, на одному – Conc2, Conc42, Myt8. Антагонізму до *C. cladosporioides* у інших актинобактерій не виявлено.

Таблиця 4.1.3

Антагоністична активність ізолятів актинобактерій щодо міцеліальних грибів *A. tenuissima*, *R. cerealis*, *F. oxysporum* та *C. cladosporioides*

Ізолят	<i>A. tenuissima</i> ONU F-24			<i>R. cerealis</i> ONU F-30			<i>F. oxysporum</i> F-54201			<i>C. cladosporioides</i> F-2235		
	BA	Г1	Г2	BA	Г1	Г2	BA	Г1	Г2	BA	Г1	Г2
Conc2	14,0±0,0	13,7±0,6	14,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	16,0±0,0	14,0±0,0	13,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	26,7±1,2	0,0±0,0
Conc17	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc11	15,3±1,2	14,0±0,0	16,0±2,0	16,0±0,0	14,0±0,0	17,3±1,2	14,7±1,2	0,0±0,0	16,7±1,2	0,0±0,0	20,0±2,0	18,7±1,2
Conc5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc18	0,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0±0,0	21,3±3,1	17,3±1,2
Myt7b	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,3±1,2	14,0±0,0	16,7±1,2
Myt5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0	17,3±1,2	16,7±3,1	17,3±1,2
Myt4b	16,7±1,2	16,7±1,2	15,3±1,2	0,0±0,0	16,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	17,3±1,2	0,0±0,0	16,0±0,0
Myt7ch	17,3±1,2	0,0±0,0	14,7±1,2	18,7±1,2	18,0±0,0	15,3±1,2	18,7±1,2	17,3±1,2	0,0±0,0	17,3±1,2	19,3±1,2	20,0±0,0
Conc4	13,7±0,6	0,0±0,0	17,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	18,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	19,3±1,2	20,7±1,2	21,3±1,2	22,7±1,2
Conc32	15,3±1,2	0,0±0,0	15,3±1,2	17,3±1,2	14,0±0,0	18,0±0,0	15,3±1,2	14,0±0,0	16,0±0,0	17,3±1,2	18,7±1,2	22,7±1,2
Conc42	0,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	16,0±2,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Myt8	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0±0,0	16,0±0,0	16,7±1,2	17,3±1,2	15,3±1,2	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc24	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	14,7±1,2	14,7±1,2	16,7±1,2	0,0±0,0	18,0±0,0	21,3±1,2	17,3±1,2	14,7±1,2
Lim4	0,0±0,0	0,0±0,0	13,7±0,6	16,0±0,0	13,7±0,6	20,7±2,3	24,0±0,0	0,0±0,0	16,7±1,2	20,0±3,5	24,0±0,0	20,7±2,3
Lim6.1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	20,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc10	14,0±0,0	14,0±0,0	15,3±1,2	14,7±1,2	14,0±0,0	17,3±1,2	14,0±0,0	0,0±0,0	18,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc1	14,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	17,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Ku7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Ku8	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Sea2	0,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc9	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	16,0±0,0	0,0±0,0	16,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

*Примітка – BA – вівсяний агар, Г1 – середовище Гаузе 1, Г2 – середовище Гаузе 2; показано середні діаметри (у мм) зон затримки росту грибів±стандартні відхилення; сірим кольором виділено ізоляти, що показали найкращі результати та були відібрані для інокуляції мікроклонованих рослин.

Антагоністичну активність до *P. variotii* на середовищах Гаузе 1, Гаузе 2 та вівсяному агарі виявили актинобактерії Conc2, Conc11, Conc5, Conc18, Myt7b, Myt5, Conc4, Conc32, Conc24, Lim4, Conc10, Conc9. На двох із випробуваних живильних середовищ антагонізм відмічено у ізолятів Myt4b, Myt7ch, Sea2. На одному – Conc42, Myt8, Conc 1. Інші ізоляти не демонстрували активність.

До *P. expansum* антагоністичні властивості були виявлені у актинобактерій Conc2, Myt7ch, Conc4, Conc42, Lim4 на всіх середовищах в експериментах, Conc11, Myt5, Myt4b, Myt8, Conc24 – на двох середовищах із трьох, та у Conc10 – тільки на одному середовищі.

Антагонізм до *A. alternata* показали ізоляти Conc4, Conc32, Conc42, Conc24, Lim4 на всіх випробуваних середовищах, на двох середовищах – Conc2, Conc11, Conc18, Myt7b, Myt5, Myt4b, Myt7ch, а на одному – Myt8, Conc10, Conc1. Антагонізму у інших актинобактерій до цього гриба не виявлено.

Антагоністичну активність до *A. niger* виявили актинобактерії Conc4, Conc32, Lim4, Conc10 на трьох середовищах, а Conc2, Myt7ch, Conc9 – на двох. Ізоляти Conc17, Conc11, Conc5, Myt7b, Myt5, Conc42, Ku7, Ku8 показали антагонізм на одному середовищі. Актинобактерії інших ізолятів не виявили антагоністичних властивостей щодо цього гриба на жодному із середовищ.

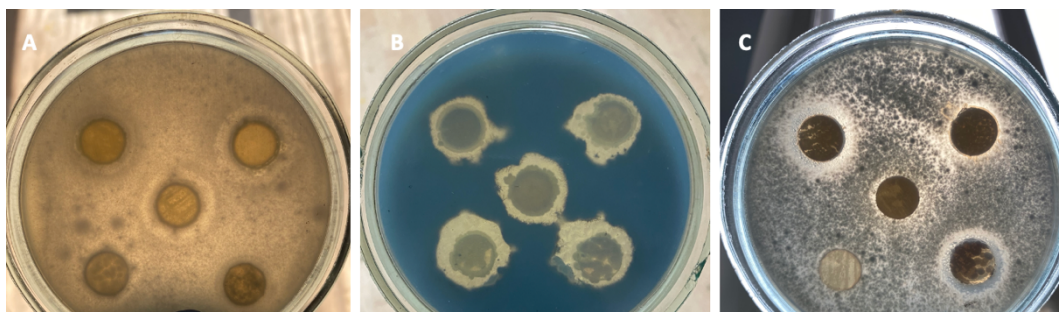


Рис. 4.1.1. Антагоністична активність ізолятів морських актинобактерій щодо: А – *F. oxysporum* F-54201; В – *A. alternata* F-16866; С – *P. expansum* F-575

Отже, у даному дослідженні показано антагоністичну активність досліджуваних бактерій до міцеліальних грибів: *A. niger*, *F. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *R. cerealis*, *P. variotii* та *P. expansum*. Дані результати співвідносяться з іншими роботами по виявленню

Таблиця 4.1.4

**Антагоністична активність ізолятів актинобактерій щодо
міцеліальних грибів *P. variotii*, *P. expansum*, *A. alternata* та *A. niger***

Ізолят	<i>P. variotii</i> F-424			<i>P. expansum</i> F-575			<i>A. alternata</i> F-16866			<i>A. niger</i> F-16706		
	BA*	Г1	Г2	BA	Г1	Г2	BA	Г1	Г2	BA	Г1	Г2
Conc2	18,7±1,2	27,3±1,2	21,1±2,3	14,0±0,0	14,3±0,6	15,3±1,2	0,0±0,0	17,3±1,2	19,3±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2
Conc17	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,7±0,6	0,0±0,0
Conc11	17,3±1,2	21,3±1,2	23,3±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	17,3±1,2	18,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0
Conc5	17,3±1,2	19,3±1,2	21,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	18,7±1,2
Conc18	16,7±1,2	25,3±1,2	23,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	21,3±2,3	15,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Myt7b	20,7±1,2	24,7±1,2	29,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,7±1,2	18,7±3,1	0,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0
Myt5	18,7±1,2	19,3±1,2	30,7±1,2	16,0±0,0	0,0±0,0	16,7±1,2	18,7±1,2	0,0±0,0	19,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	16,7±1,2
Myt4b	14,0±0,0	0,0±0,0	18,7±1,2	14,7±1,2	0,0±0,0	14,0±0,0	16,7±1,2	0,0±0,0	17,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Myt7ch	0,0±0,0	26,7±1,2	29,3±1,2	14,0±0,0	16,7±1,2	17,3±1,2	0,0±0,0	17,3±1,2	18,7±1,2	0,0±0,0	16,7±1,2	20,0±0,0
Conc4	22,0±0,0	26,0±2,0	31,3±1,2	16,0±0,0	17,3±1,2	17,3±1,2	20,0±0,0	18,7±1,2	25,3±3,1	15,3±1,2	15,3±1,2	18,7±1,2
Conc32	22,7±1,2	34,7±1,2	32,7±1,2	16,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	17,3±1,2	21,3±2,3	24,7±1,2	14,0±0,0	14,7±1,2	20,0±0,0
Conc42	14,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	16,0±0,0	16,7±1,2	19,3±2,3	15,3±1,2	14,0±0,0	0,0±0,0	16,0±0,0	0,0±0,0
Myt8	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	14,7±1,2	17,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc24	17,3±1,2	28,0±0,0	26,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	14,7±1,2	17,3±2,3	18,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Lim4	20,0±0,0	30,7±2,3	34,7±1,2	15,3±1,2	14,0±0,0	14,0±0,0	18,0±0,0	20,7±1,2	22,7±1,2	16,7±1,2	15,3±1,2	15,3±1,2
Lim6.1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc10	20,7±1,2	31,3±3,1	29,3±3,1	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,7±2,3	0,0±0,0	18,0±0,0	24,7±2,3	19,3±3,1
Conc1	0,0±0,0	0,0±0,0	23,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Ku7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,7±1,2	0,0±0,0
Ku8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,7±1,2	0,0±0,0
Sea2	14,0±0,0	0,0±0,0	15,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Conc9	21,3±1,2	18,7±3,1	27,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	19,3±1,2	22,0±0,0	0,0±0,0

*Примітка – BA – вівсяний агар, Г1 – середовище Гаузе 1, Г2 – середовище Гаузе 2; показано середні діаметри (у мм) зон затримки росту грибів±стандартні відхилення; сірим кольором виділено ізоляти, що показали найкращі результати та були відібрані для інокуляції мікроклонованих рослин.

антагоністичних властивостей актинобактерій щодо фітопатогенних грибів (Musa et al. 2020; Aallam et al. 2021; Borah et al. 2022; Alblooshi et al. 2023).

Також, уже відомі і дослідження зі встановлення антагоністичної активності саме морських актинобактерій щодо фітопатогенів, де дослідні мікроорганізми показали високий рівень антагонізму щодо *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* та *Fusarium solani* (Uba et al. 2019).

Окрім того, інші дослідники відмічали, що актинобактерії здатні захищати рослини не тільки шляхом прямого пригнічення фітопатогенів, але і через стимуляцію індукованої системної резистентності, тобто активацію власних захисних механізмів у рослин (Ebrahimi-Zarandi et al. 2022). Дані особливості збільшують потенціал використання актинобактерій як агентів біоконтролю у ґрунті.

Таким чином, найкращими антагоністами у рамках наших досліджень є ізоляти Conc32, Conc10, Myt7ch, Conc4 та Lim4, що виявили здатність до антагонізму на максимальному різноманітті дослідних живильних середовищ та найбільші діаметри зон затримки росту міцеліальних грибів.

4.2. Вплив дослідних бактерій на ріст модельних рослин крес-салату

Для визначення рістстимулювального потенціалу дослідних бактерій, а також для виключення їх можливого фітотоксичного ефекту, проведено дослідження на модельній рослині крес-салату. При цьому оцінювали вплив на проростання насіння на 2 та 3 добу, а також середню кількість коренів на рослину та середню довжину пагонів і коренів у проростків крес-салату на 7 та 9 добу.

***E. italicus* ONU547.** У результаті проведених досліджень встановлено, що вплив бактерій *E. italicus* ONU547 у різних концентраціях у більшості випадків відрізнявся як від контролю, так і між собою (рис. 4.2.1).

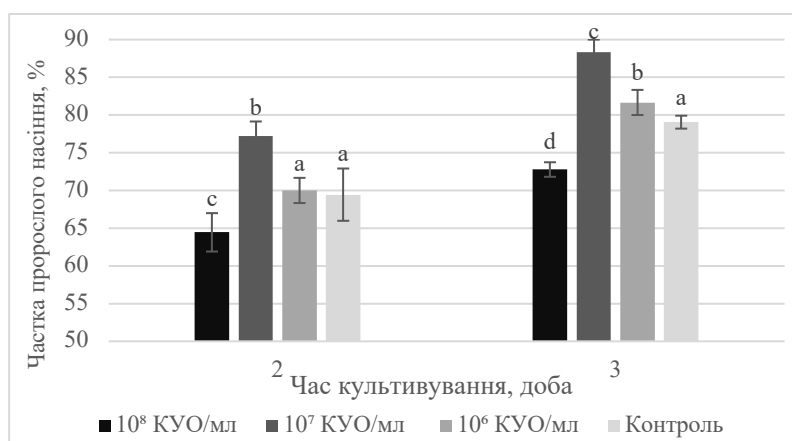


Рис. 4.2.1. Проростання насіння крес-салату за інокуляції *E. italicus* ONU547

В концентрації 10^7 КУО/мл, бактерії позитивно впливали на проростання насіння, підвищуючи частку пророслого насіння як на 2-у, так і на 3-ю добу – на 7,8% та 9,3%, відповідно (рис. 4.2.2).

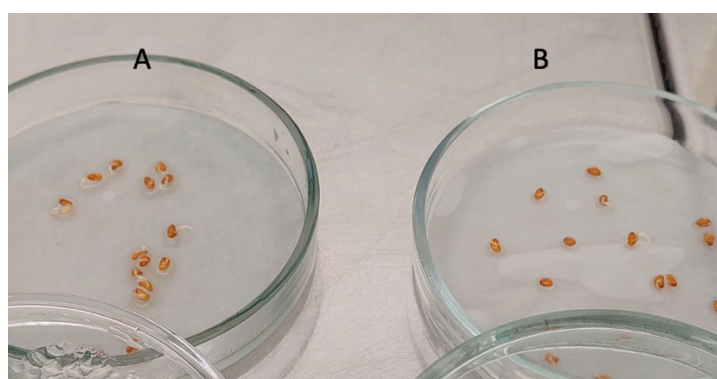


Рис. 4.2.2. Проростання насіння крес-салату на 3 добу після інокуляції *E. italicus* ONU547 у концентрації 10^7 КУО/мл: А – інокульоване насіння, В – контроль

Бактерії в концентрації 10^6 КУО/мл не спричиняли статистично значущих змін порівняно з контролем по даному показнику на 2-у добу, але на 3-ю вже підвищували відсоток проростання на 2,5%, а в концентрації 10^8 КУО/мл показали певну інгібувальну дію на проростання насіння. Проростання було меншим на 5,0% за контроль на 2 добу, та менше на 6,3% - на 3 добу експерименту.

Загалом, якщо на другу добу дослідна група проростків, інокульованих 10^6 КУО/мл *E. italicus*, знаходилася за показником проростання на рівні з контролем, то вже на третю добу досліді різниця у проростанні була наявна між всіма

експериментальними групами, а найбільшу частку пророслого насіння спостерігали за інокуляції бактеріями в концентрації 10^7 КУО/мл.

За показником середньої кількості коренів на 7-му та 9-ту добу культивування спостерігали статистично достовірну різницю у впливі між усіма дослідними варіантами (рис. 4.2.3).

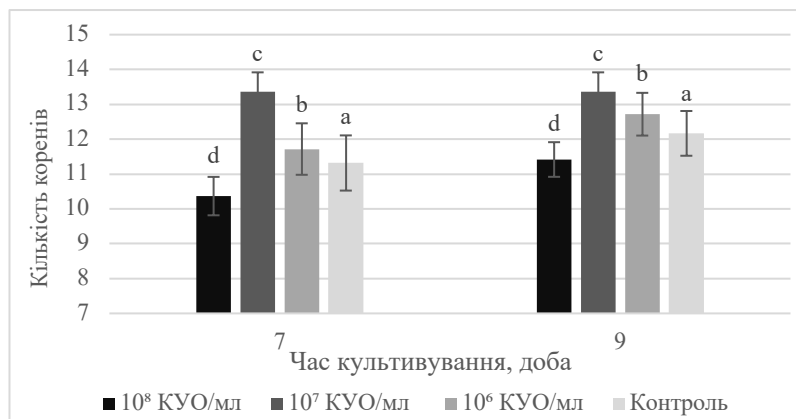


Рис. 4.2.3. Середня кількість коренів у проростків крес-салату на 7 та 9 доби культивування за інокуляції *E. italicus* ONU547

Середня кількість коренів на 7 добу була найвищою у проростків, експонованих з 10^7 КУО/мл *E. italicus* – $13,4 \pm 0,6$ коренів. Незважаючи на те, що на 9 добу середня кількість залишалась на тому ж рівні, а у контролі виросла на 0,9 коренів, значення цього показника серед усіх дослідних груп все ще було найбільшим у проростків, інокульованих 10^7 КУО/мл бактерій. При цьому, у проростків, експонованих з 10^8 КУО/мл *E. italicus*, спостерігали пригнічення утворення коренів на 7 та 9 добу, а бактерії у концентрації 10^6 КУО/мл показали мінімальний рівень позитивного впливу.

За середньою довжиною коренів та пагонів на 7-му та 9-ту добу також виявили статистично достовірну відмінність між усіма дослідними групами.

Середня довжина пагону на 7-му добу була найбільшою у проростків, інокульованих бактеріями *E. italicus* в концентрації 10^6 КУО/мл, і складала $24,4 \pm 1,1$ мм. За обробки 10^7 КУО/мл бактерій довжина пагону становила, в середньому, $19,7 \pm 0,6$ мм, а у варіанті з 10^8 КУО/мл була близька до контрольних значень – $11,7 \pm 0,7$ мм. Середня довжина коренів була найбільшою у проростків

з 10^7 КУО/мл *E. italicus* – $27,7 \pm 1,0$ мм, трохи меншу довжину мали проростки, інокульовані бактеріями в концентрації 10^6 КУО/мл – $25,3 \pm 0,8$ мм, контрольний показник середньої довжини коренів становив $21,1 \pm 1,1$ мм, а у проростків, оброблених 10^8 КУО/мл *E. italicus* ONU547, довжина коренів складала, у середньому, $11,1 \pm 0,7$ мм (рис. 4.2.4).

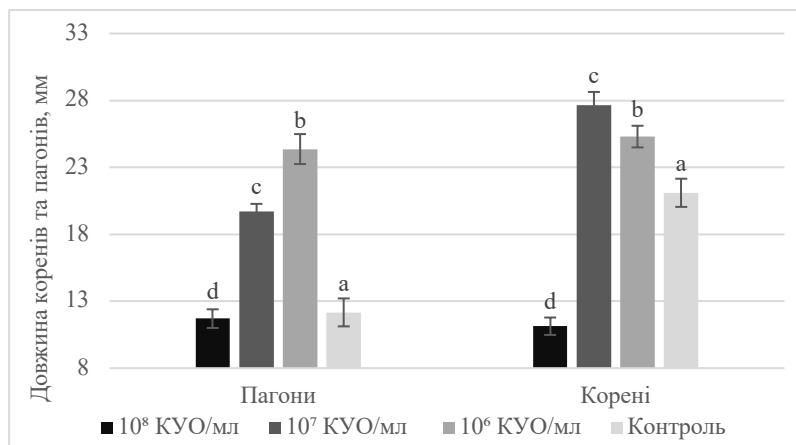


Рис. 4.2.4. Середня довжина коренів і пагонів проростків крес-салату на 7 добу культивування за інокуляції *E. italicus* ONU547

На 9 добу (рис. 4.2.5) динаміка показників більшою мірою зберігалася – найбільша середня довжина пагонів виявлена у проростків, оброблених 10^6 КУО/мл та 10^7 КУО/мл *E. italicus* ($21,8 \pm 0,6$ мм та $25,3 \pm 0,8$ мм, відповідно). Середня довжина пагонів у варіанті з 10^8 КУО/мл бактерій була на 0,5 мм меншою за контроль, а довжина коренів у цьому випадку була меншою майже у два рази ($14,4 \pm 0,4$ мм та $26,6 \pm 1,0$ мм). Показник середньої довжини коренів у проростків, оброблених 10^7 КУО/мл *E. italicus*, на 9 добу становив $32,3 \pm 0,7$ мм. А середня довжина коренів у проростків з 10^6 КУО/мл бактерій на 9 добу була найвищою – $35,9 \pm 0,8$ мм.

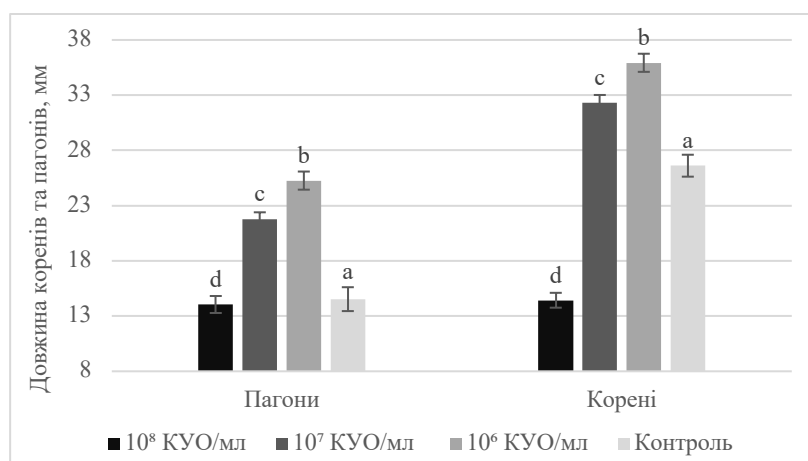


Рис. 4.2.5. Середня довжина коренів і пагонів проростків крес-салату на 9 добу культивування за інокуляції *E. italicus* ONU547

Таким чином, виявлено, що *E. italicus* ONU547 має вплив на рослини, який залежить від концентрації бактерій при інокуляції. При цьому бактерії в концентрації 10^8 КУО/мл мали певний негативний ефект, а в концентрації 10^6 - 10^7 КУО/мл впливали як стимулятори росту рослин.

У цьому дослідженні показано ефект інокуляції суспензіями клітин мікроорганізмів, а не їх очищеними метаболітами, як часто зустрічається у літературі (Lee et al. 2015; Pellegrini et al. 2020; Chaurasia et al. 2022; Msimbira et al. 2022). Той факт, що для потенційного створення біопрепаратів на основі *E. italicus* ONU547 є можливість не витрачати час на виділення та очищення специфічних синтезованих сполук, а просто використовувати клітинну масу, робить перспективу створення препарату більш економічно вигідною.

Також встановлено, що концентрація бактерій при інокуляції відіграє важливу роль у характері впливу на рослини. Наприклад, при інокуляції насіння крес-салату *in vitro*, бактерії в концентрації 10^8 КУО/мл пригнічували проростання та ріст рослин. У свою чергу, концентрації 10^6 та 10^7 КУО/мл проявили рістстимулювальні властивості. За показниками довжини коренів та пагонів проростків *in vitro* на 9 добу спостережень більш ефективною була концентрація 10^6 КУО/мл, а більша частка пророслого насіння та кількість

коренів були у проростків, інокульованих бактеріями в концентрації 10^7 КУО/мл *E. italicus*.

В інших дослідженнях зі встановлення впливу ентерококів на ріст рослин, нами відмічено використання різних концентрацій бактерій, різні процедури інокуляції та дослідні види рослин. Відповідно, спостережувані ефекти дуже відрізнялися у залежності від цих факторів. Наприклад, в експериментах Chaurasia et al. (2022), інокульовали ґрунт у концентрації 8×10^5 КУО/кг. У цьому випадку проростання насіння кукурудзи відбувалося на три дні швидше, ніж у контролі, висота рослин була на 53,7% більшою, але жодної різниці у кількості вузлів зареєстровано не було. У дослідженні Kumar et al. (2016), насіння *Vigna tingo* було інокульоване бактеріальною суспензією (10^8 КУО/мл), змішаною з 1% карбоксіметилцелюлозою. Це відобразилось у підвищенні частки пророслого насіння, висоти пагонів і довжини коренів на 16,7%; 23,7% та 27,3%, відповідно. У експерименті Lee et al. (2012), бактеріальна інокуляція суттєво підвищила довжину пагонів рослин рису, але жодним чином не вплинула на біометричні показники рослин огірка. У той самий час, безклітинний екстракт підвищив довжину пагонів рослин на 40%. Проте, концентрація інокулюму та точна процедура інокуляції не були детально описані у даному дослідженні. З огляду на різноманітність отриманих результатів, є необхідність детальніше вивчати взаємодії ентерококів та рослин, а також враховувати видовий фактор, оптимальну концентрацію та процедуру інокуляції.

Бактерії роду *Bacillus*. У ході проведених досліджень встановлено, що бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553 та *B. subtilis* ONU559 у концентрації 10^8 КУО/мл позитивно впливали на проростання, підвищуючи відсоток пророслого насіння на 2 добу на 9,5%; 6,1% та 5,6%, відповідно (рис. 4.2.6).

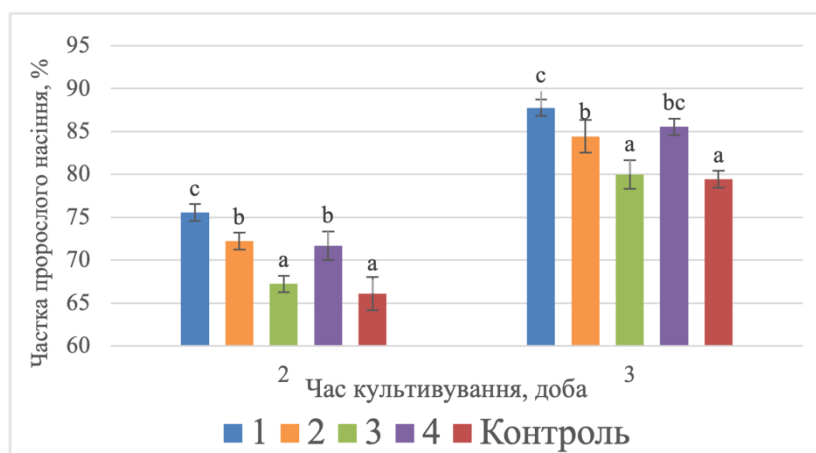


Рис. 4.2.6. Проростання насіння крес-салату за інокуляції бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

На 3 добу культивування різниця з контролем складала 8,4%; 5,0% та 6,2% для вищезазначених штамів. Інокуляція насіння бактеріями штаму *B. pumilus* ONU554 не спричинила статистично значущих змін у порівнянні з контролем.

Середня кількість коренів на 7 добу була найвищою у проростків, експонованих з суспензією *B. megaterium* ONU500 – $13,0 \pm 0,8$ коренів. Також істотне підвищення середньої кількості коренів у порівнянні з контролем спостерігали за інокуляції з бактеріями *B. velezensis* ONU553 та *B. subtilis* ONU559 – $12,4 \pm 0,6$ та $12,8 \pm 0,5$ коренів, у той час як у контрольних проростків – $11,3 \pm 0,7$ коренів. Інокуляція бактеріями *B. pumilus* ONU554 також мала позитивний вплив, але він був мінімальним у порівнянні з іншими штамми у досліді – на 0,4 кореня більше за контроль (рис. 4.2.7).

На 9 добу загальна тенденція зберігалася для всіх експериментальних груп: інокульовані бактеріями проростки мали найбільшу кількість коренів, що перевищувала контрольні: в середньому, на 0,3-2,2 корені. За інокуляції бактеріями *B. megaterium* ONU500 на 9 добу проростки мали найвищий середній показник – $14,6 \pm 0,6$ коренів.

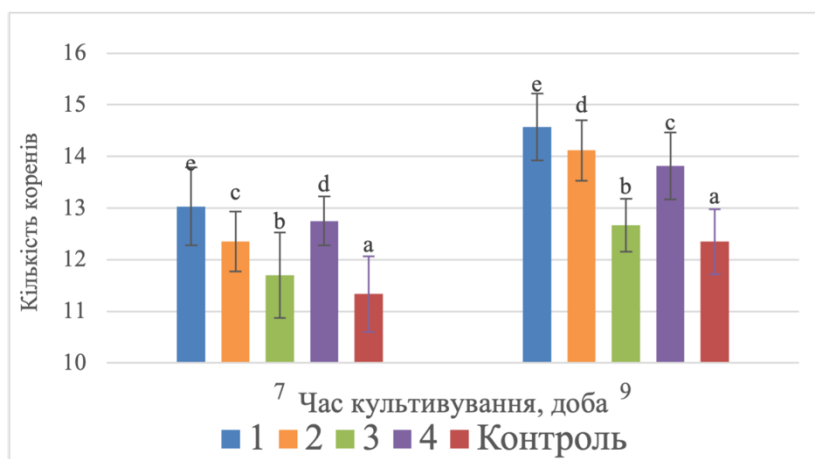


Рис. 4.2.7. Середня кількість коренів у проростків крес-салату на 7 та 9 доби культивування за інокуляції бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Середня довжина пагону на 7 добу була також найбільшою у проростків, оброблених бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500, і складала $15,4 \pm 0,8$ мм. За інокуляції з *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 та *B. subtilis* ONU559 довжина пагону становила, в середньому, $14,1 \pm 1,0$ мм, $13,5 \pm 0,9$ та $14,5 \pm 0,8$ мм, а у контрольному варіанті – $12,6 \pm 1,4$ мм (рис. 4.2.8).

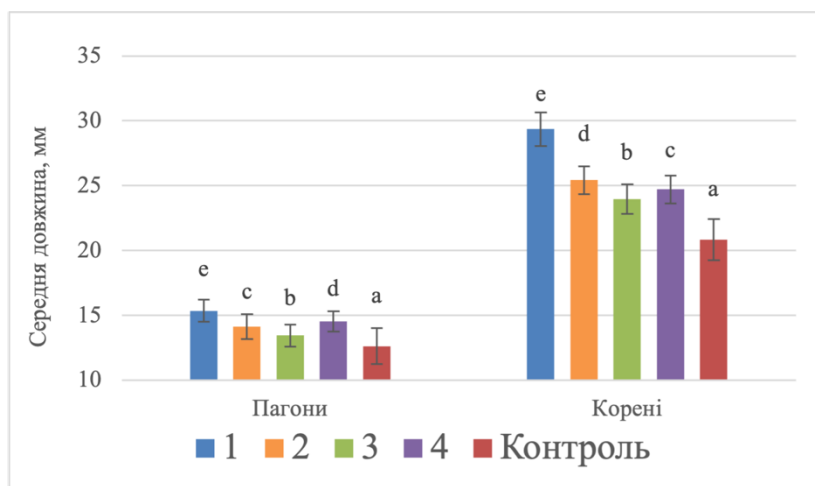


Рис. 4.2.8. Середня довжина коренів і пагонів проростків крес-салату на 7 добу культивування за інокуляції бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Найбільшою середня довжина коренів була у проростків, експонованих з суспензією бактерій *B. megaterium* ONU500 – $29,4 \pm 1,2$ мм на 7-му добу. Найменшу довжину коренів серед інокульованих проростків мали ті, що були оброблені бактеріями *B. pumilus* ONU554.

Схожі результати спостерігали і для довжини коренів та пагонів на 9 добу. Збільшення цих показників спостерігали у всіх дослідних групах порівняно з контролем (рис. 4.2.9).

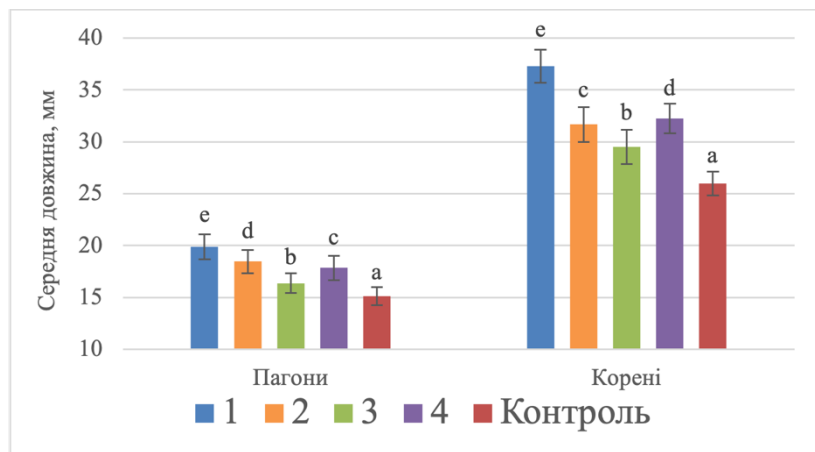


Рис. 4.2.9. Середня довжина коренів і пагонів проростків крес-салату на 9 добу культивування за інокуляції бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

На 9 добу динаміка показників залишалася незмінною, але у кількісному вираженні стала більшою. Для штамів *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 різниця з контролем у середній довжині пагонів складала 4,8 мм, 3,4 мм, 1,3 мм та 2,8 мм, відповідно. У свою чергу, різниця у довжині коренів складала 11,3 мм, 5,7 мм, 3,5 мм та 6,4 мм, відповідно.

Таким чином, виявлено, що інокуляція бактеріями штамів *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 мала рістстимулювальний вплив на рослини, підвищуючи частку пророслого насіння, середню кількість коренів, середню довжину пагонів та коренів проростків крес-салату *Lepidium sativum* L. *in vitro*. У нашому експерименті найбільш

перспективним виявився штам *B. megaterium* ONU500, також високі результати показали штами *B. velezensis* ONU553 та *B. subtilis* ONU559 за усіма аналізованими показниками. Інокуляція насіння бактеріями штаму ONU554 не демонструвала відмінностей із контролем за показником частки пророслого насіння, але з мінімальною статистично достовірною різницею позитивно вплинула на інші характеристики.

Ізоляти актинобактерій. У результаті проведених досліджень встановлено, що досліджувані актинобактерії у більшості випадків відрізнялися за впливом як від контролю, так і між собою (табл. 4.2.1).

За показником проростання насіння на 2-гу добу бактерії ізоляту Conc4 показали найкращий ефект, що статистично достовірно відрізнявся як від контролю, так і від усіх інших бактерій в експерименті.

Високу у порівнянні з контролем частку пророслого насіння спостерігали за інокуляції бактеріями Conc10, Myt7ch, Conc11. Ізоляти Conc32, Myt7b, Conc42, Lim4, Lim 6.1, Conc24 менш виражено, але також позитивно впливали на проростання порівняно з контролем. На 3-тю добу культивування можна виділити групу ізолятів, що на одному рівні позитивно впливала на проростання насіння крес-салату – це актинобактерії Conc10, Conc24, Conc32, Conc4, Myt7ch, Myt7b, Conc42, Conc11. Інокуляція іншими ізолятами не сприяла підвищенню рівня проростання насіння на момент спостережень.

За показником середньої кількості утворених коренів на рослину на 7-му добу найефективнішою виявилася інокуляція бактеріями Conc32, що позитивно відрізнялася як від контролю, так і від інших ізолятів, окрім Myt7b. Також вищу за контроль кількість коренів спостерігали за інокуляції бактеріями Conc11, Conc10, Myt7ch, Conc4, Conc42, Conc5. У свою чергу, на 9-ту добу культивування найбільший ефект на формування коренів у рослин виявили бактерії Conc32, Myt7ch, Conc11. Кращі за контроль показники мали також ізоляти Conc10, Myt7b, Conc4, Conc42, Conc5.

Таблиця 4.2.1

Біометричні показники проростків крес-салату за інокуляції актинобактеріями

Ізолят	Частка пророслого насіння, %		Кількість коренів		Довжина коренів, мм		Довжина пагонів, мм	
	2 доба	3 доба	7 доба	9 доба	7 доба	9 доба	7 доба	9 доба
Conc2	70,0±3,0 ^{abc}	82,0±1,7 ^{ab}	11,4±0,5 ^{abc}	12,6±0,5 ^{cd}	20,6±0,9 ^{cd}	25,8±1,1 ^{efg}	11,5±1,2 ^{bcde}	13,8±1,1 ^{efghi}
Conc17	73,3±3,5 ^{cd}	83,3±3,5 ^{abc}	11,5±0,5 ^{bc}	12,6±0,6 ^{cde}	20,8±0,9 ^{cd}	26,1±0,9 ^{gh}	11,2±1,0 ^{abc}	12,9±1,2 ^{ab}
Conc11	89,0±1,7 ^{hi}	93,3±3,5 ^d	12,7±0,5 ^{fg}	13,9±0,6 ^{ij}	23,4±0,6 ^h	29,2±0,9 ^m	14,1±1,0 ^{ij}	16,4±0,9 ^{lm}
Conc5	71,0±3,5 ^{bc}	83,7±1,2 ^{abc}	11,7±0,4 ^{de}	12,8±0,7 ^{ef}	20,8±1,0 ^{de}	26,4±0,9 ^{hi}	11,1±0,9 ^a	12,8±1,1 ^a
Conc18	71,3±5,1 ^{bc}	85,7±2,3 ^{abc}	11,4±0,5 ^{bc}	12,5±0,8 ^{cd}	20,8±0,8 ^{cd}	25,4±1,1 ^{cde}	11,3±1,2 ^{abcd}	13,6±1,2 ^{def}
Myt7b	86,0±1,7 ^{ghi}	94,3±2,3 ^d	12,8±0,6 ^{gh}	13,6±0,6 ^{gh}	22,9±0,7 ^g	28,3±1,0 ^l	12,5±0,9 ^h	14,8±1,2 ^k
Myt5	71,0±1,7 ^{bc}	82,0±1,7 ^{ab}	11,4±0,7 ^{bc}	12,5±0,6 ^{cd}	21,0±1,2 ^{de}	25,4±0,9 ^{cd}	11,1±1,0 ^a	13,1±1,0 ^{abc}
Myt4b	70,3±5,8 ^{abc}	84,3±2,3 ^{abc}	11,4±0,5 ^{ab}	12,6±0,8 ^{cd}	20,8±0,8 ^{cd}	26,0±1,1 ^{fgh}	12,0±0,9 ^{fg}	14,5±0,8 ^{jk}
Myt7ch	89,0±1,7 ^{hi}	95,7±2,3 ^d	12,5±0,6 ^f	13,9±0,8 ^{ij}	23,6±0,9 ^h	28,5±1,2 ^l	14,3±1,1 ^j	16,6±0,9 ^{lm}
Conc4	92,0±1,7 ⁱ	95,7±2,3 ^d	12,4±0,6 ^f	13,5±0,6 ^g	22,7±0,9 ^g	27,5±0,9 ^k	14,2±1,0 ^j	16,2±1,2 ^l
Conc32	86,7±3,5 ^{ghi}	95,7±2,3 ^d	12,9±0,4 ^h	14,1±0,7 ⁱ	24,2±0,8 ⁱ	31,3±0,9 ^o	14,8±0,9 ^k	17,3±1,3 ⁿ
Conc42	84,3±2,3 ^{fgh}	93,3±4,0 ^d	11,9±0,5 ^e	12,9±0,5 ^f	21,9±0,7 ^f	26,7±1,0 ^{ij}	11,6±1,0 ^{cdef}	13,7±1,1 ^{defgh}
Myt8	64,3±2,3 ^a	85,7±2,3 ^{abc}	11,4±0,6 ^{abc}	12,6±0,8 ^{cde}	20,6±0,9 ^{cd}	25,7±1,3 ^{defg}	11,2±1,0 ^{ab}	13,3±1,1 ^{bcd}
Conc24	79,0±1,7 ^{def}	95,7±2,3 ^d	11,6±0,5 ^{cd}	12,7±0,7 ^{def}	20,8±1,1 ^{cd}	25,5±1,1 ^{cde}	12,2±0,9 ^{gh}	14,7±0,8 ^k
Lim4	82,0±1,7 ^{efg}	87,7±4,0 ^c	11,5±0,7 ^{bc}	12,4±0,6 ^{bc}	21,7±0,8 ^f	26,9±0,9 ^j	13,8±1,1 ⁱ	16,5±1,2 ^{lm}
Lim6.1	78,0±1,7 ^{de}	86,7±3,1 ^{bc}	11,4±0,6 ^{ab}	12,6±0,5 ^{cd}	21,2±0,8 ^e	26,0±1,1 ^{fgh}	11,7±1,2 ^{def}	13,9±1,1 ^{efghi}

Продовження таблиці 4.2.1

Ізолят	Частка пророслого насіння, %		Кількість коренів		Довжина коренів, мм		Довжина пагонів, мм	
	2 доба	3 доба	7 доба	9 доба	7 доба	9 доба	7 доба	9 доба
Conc10	89,3±2,1 ^{hi}	96,7±3,5 ^d	12,6±0,6 ^{fg}	13,8±0,7 ^{hi}	24,2±1,0 ⁱ	29,9±1,1 ⁿ	14,4±0,9 ^{jk}	16,8±0,9 ^m
Conc1	68,7±5,1 ^{abc}	83,3±3,5 ^{abc}	11,5±0,5 ^{bc}	12,5±0,8 ^{cd}	20,8±0,8 ^{de}	25,3±1,5 ^{cd}	11,6±1,2 ^{cdef}	13,9±1,3 ^{fghi}
Conc8	70,0±3,0 ^{abc}	85,3±4,0 ^{abc}	11,4±0,6 ^{abc}	12,4±0,7 ^{bc}	20,8±1,3 ^{cd}	25,5±1,2 ^{cde}	12,0±1,0 ^{fg}	14,1±1,1 ^{ghij}
Ku7	70,3±5,8 ^{abc}	80,3±3,5 ^a	11,2±0,6 ^a	12,1±0,7 ^a	18,9±0,9 ^a	23,8±0,9 ^a	11,1±1,2 ^a	13,3±1,2 ^{bcd}
Ku8	71,0±1,7 ^{bc}	84,3±2,3 ^{abc}	11,3±0,7 ^{ab}	12,2±0,5 ^{ab}	19,3±0,8 ^b	24,1±0,8 ^b	11,8±0,9 ^{efg}	14,1±1,2 ^{hij}
Sea2	68,0±1,7 ^{abc}	82,0±1,7 ^{ab}	11,4±0,7 ^{bc}	12,4±0,8 ^{bc}	20,7±1,2 ^{cd}	25,2±0,9 ^c	11,9±1,1 ^{efg}	13,7±1,1 ^{defg}
Conc9	65,7±3,8 ^{ab}	84,3±2,3 ^{abc}	11,4±0,5 ^{abc}	12,4±0,7 ^{bcd}	20,5±1,0 ^c	26,1±0,9 ^{gh}	11,4±1,2 ^{abcd}	13,4±1,3 ^{cde}
Контроль	67,7±5,0 ^{abc}	83,3±3,5 ^{abc}	11,4±0,5 ^{ab}	12,5±0,5 ^{cd}	20,7±1,2 ^{cd}	25,6±1,2 ^{cdef}	11,9±1,3 ^{efg}	14,3±1,4 ^{ij}

**Примітка – сірим кольором виділено ізоляти, що показали найкращі результати та були відібрані для інокуляції мікроклонованих рослин.*

За середньою довжиною коренів на 7-му добу культивування ізоляти Ku7 та Ku8 показали пригнічувальний ефект порівняно з контролем. Найбільшу довжину коренів спостерігали у проростків, інокульованих актинобактеріями Conc10 та Conc32 (рис. 4.2.10).

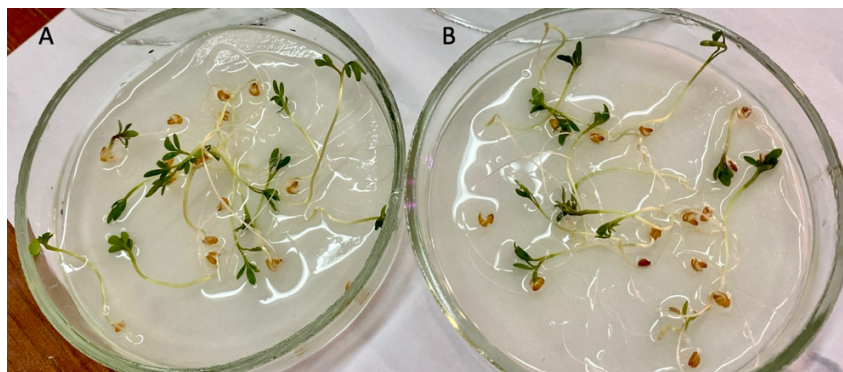


Рис. 4.2.10. Ріст проростків крес-салату за інокуляції ізолятом актинобактерій Conc4: А – інокульоване насіння, В – контроль

Також більшою за контроль середня довжина коренів була за інокуляції бактеріями Myt7ch, Conc11, Myt7b, Conc4, Conc42, Lim4, Lim 6.1. На 9 добу дослідів затримка росту коренів за інокуляції ізолятами Ku7 та Ku8 залишалася, а найвищу середню довжину коренів серед усіх інокульованих рослин мали ті, що експонувалися з бактеріями Conc32. Позитивний ефект по подовженню коренів спостерігали також за інокуляції актинобактеріями Conc10, Conc11, Myt7ch, Myt7b, Conc4, Lim4, Conc42, Conc5, Conc17, Conc9 (перераховано у порядку зменшення середніх значень). Інші ізоляти не демонстрували впливу на цей показник.

Важливим показником росту дослідної рослини є значення середньої довжини пагону. Встановлено, що на 7-му добу культивування 7 ізолятів актинобактерій (бактерії Ku7, Conc5, Myt5, Myt8, Conc17, Conc18 та Conc9) суттєво не впливали на цей показник а, в деяких випадках, навпаки викликали невелику затримку росту пагону. Цікаво, що з продовженням культивування (9 доба) ефект затримки росту пагонів крес-салату продовжувався, а в деяких варіантах іноді посилювався. Тому ізоляти актинобактерій Conc5, Conc17, Myt5, Ku7, Myt8, Conc9, Conc18, Sea2, Conc42 були відмічені як неперспективні для

подальших досліджень по даному показнику. Статистично достовірно вищу за контроль довжину пагонів проростки мали за інокуляції ізолятами Conc10, Myt7ch, Conc4, Conc11, Lim4, Myt7b. Найбільшу довжину пагону на 7 день культивування реєстрували за інокуляції актинобактеріями Conc32. Така тенденція впливу дослідних ізолятів спостерігалась і на 9 день культивування крес-салату. Найбільшу довжину пагонів спостерігали у проростків, інокульованих Conc32.

Під час експериментів із пророщування насіння крес-салату *in vitro*, 23 ізоляти актинобактерій показали різноманітні ефекти як на проростання, так і на біометричні показники проростків. Схожий ефект спостерігали Retnowati et al. (2019) за інокуляції проростків рослин рису актинобактеріями, виділеними із морських губок – це призводило до підвищення біометричних показників на 9,9-13,9% у порівнянні з контролем.

Цікаво, що в наших експериментах ті бактерії, що показали найвищий рівень антагонізму до фітопатогенних грибів, у більшості випадків демонстрували також і рістстимулювальні властивості. Також відмічено певні ізоляти, що показали пригнічувальний вплив на ріст пагонів або коренів. Наприклад, проростки, інокульовані бактеріями Ku7, показали меншу середню довжину як коренів, так і пагонів під час усього експерименту. Варто відмітити, що саме цей ізолят було виділено з Куяльницького лиману (м. Одеса) – середовища із дуже високим ступенем солоності. Можливо, дані актинобактерії адаптувалися до екстремальних умов шляхом синтезу сполук, що у рамках наших експериментів призводили до пригнічення росту проростків.

У результаті, бактерії Conc32, Conc4, Myt7ch, Lim4 були відібрані для перевірки їх дії на мікроклоновані рослини. Серед актинобактерій, що не проявили високої антагоністичної активності, але показали потенціал як стимулятори росту рослин, було обрано ізолят Conc11 для подальших експериментів.

РОЗДІЛ 5. АДАПТАЦІЯ МІКРОКЛОНОВАНИХ РОСЛИН ДО УМОВ *EX VITRO* З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРООРГАНІЗМІВ

5.1. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з бактеріями *E. italicus* ONU547

На етапі адаптації мікроклонованих рослин до нестерильних умов оточуючого середовища інокуляція бактеріями *E. italicus* ONU547 показала позитивний вплив на біометричні показники саджанців, а також на рівень їх приживлюваності у ґрунті порівняно з контролем. Такий ефект спостерігали на обох дослідних рослинах – павловнії та ожині.

Приживлюваність. Результати обчислень приживлюваності показали, що, в середньому, для павловнії на 30-ту добу найбільшу кількість життєздатних рослин спостерігали у групі, в якій мікроклони інокулювали 10^7 КУО/мл *E. italicus* ONU547 – $73,7 \pm 0,5\%$, що було на 6,7% вище за контроль. За інокуляції 10^6 КУО/мл *E. italicus* приживлюваність знаходилася на рівні $72,6 \pm 0,5\%$, що на 5,6% більше за контроль (табл. 5.1.1).

Таблиця 5.1.1

Середнє значення приживлюваності рослин павловнії та ожини після експозиції з *E. italicus* ONU547

Час культивування, доба	Концентрація бактерій, КУО/мл	Приживлюваність мікроклонів павловнії, %	Приживлюваність мікроклонів ожини, %
7	10^6	$84,4 \pm 2,7^{ab}$	$79,6 \pm 1,2^b$
	10^7	$88,9 \pm 0,8^b$	$83,0 \pm 1,2^b$
	Контроль	$80,7 \pm 0,5^a$	$73,0 \pm 2,8^a$
14	10^6	$75,6 \pm 1,4^b$	$65,2 \pm 0,9^c$
	10^7	$77,4 \pm 0,9^b$	$70,4 \pm 0,9^b$
	Контроль	$71,9 \pm 0,8^a$	$51,9 \pm 2,4^a$
30	10^6	$72,6 \pm 0,5^b$	$63,7 \pm 1,2^b$
	10^7	$73,7 \pm 0,5^b$	$67,4 \pm 1,2^b$
	Контроль	$67,0 \pm 1,2^a$	$51,5 \pm 1,6^a$

Приживлюваність рослин ожини також зростала найбільше при використанні бактерій у концентрації 10^7 КУО/мл і становила на 30-ту добу $67,4 \pm 1,2\%$, що дозволило підвищити приживлюваність на $15,9\%$ порівняно з контролем. У групі мікроклонів, що експонували з 10^6 КУО/мл бактерій, приживлюваність збільшилася на $12,2\%$ на останню добу спостережень (табл. 5.1.1).

Під час досліджень також відмічали різницю впливу різних концентрацій бактерій між собою. При адаптації мікроклонів павловнії, на 7-му добу *E. italicus* тільки в концентрації 10^7 КУО/мл показав статистично достовірний вплив на приживлюваність, а на 14-ту та 30-ту добу вплив бактерій в обох концентраціях був статистично однаковим. Під час адаптації мікроклонів ожини виявлено, що на 7-му добу спостережень бактерії у концентраціях 10^6 та 10^7 КУО/мл впливають однаково, на 14-ту добу за концентрації 10^7 КУО/мл *E. italicus* виявилася кращою за 10^6 КУО/мл, а на 30-ту добу бактерії в обох дослідних концентраціях знову показали однаковий рівень впливу.

Таким чином, використання бактерій *E. italicus* ONU547 у концентраціях 10^6 та 10^7 КУО/мл підвищило приживлюваність мікроклонів павловнії та ожини порівняно з контролем.

Середня висота надземної частини рослин. Показано, що бактерії *E. italicus* впливали на ростові процеси у рослин. На рис. 5.1.1. та рис. 5.1.2 відображено динаміку приросту середньої висоти рослин павловнії та ожини від першої доби висадки у ґрунт до 30-ї доби адаптації.

Під час адаптації рослин павловнії було зафіксовано відмінності між контролем та мікроклонами, інокульованими бактеріями (рис. 5.1.1).

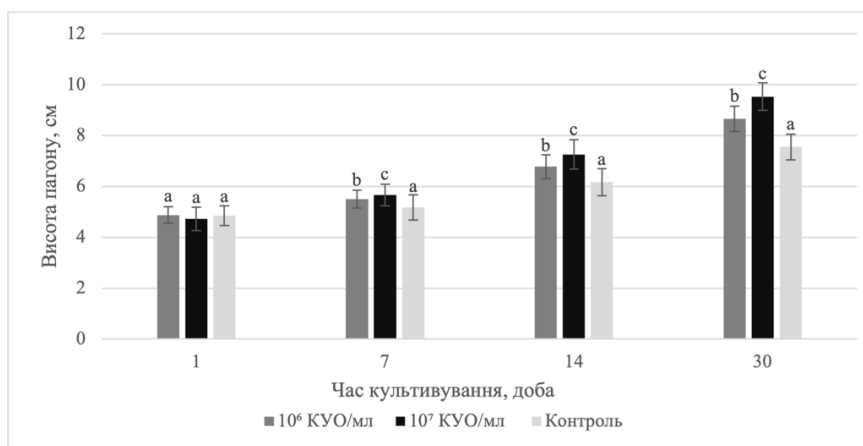


Рис. 5.1.1. Середня висота надземної частини рослин павловнії за інокуляції *E. italicus* ONU547

Рослини, експоновані з *E. italicus* ONU547 обох використаних концентрацій, показали більший приріст пагонів протягом усіх днів спостережень, і на 30 добу середня висота рослин павловнії, інокульованих 10⁶ та 10⁷ КУО/мл бактерій, становила 9,5±0,5 см та 8,7±0,5 см відповідно, у той час як контрольні рослини мали середню висоту 7,6±0,5 см. При цьому, різницю впливу дослідних концентрацій *E. italicus* від контролю та між собою спостерігали вже з 7-ї і до останньої доби експерименту.

З рис. 5.1.2 видно, що середня висота рослин ожини закономірно зростала у часі, але найбільший приріст показали мікроклони, що обробляли бактеріями у концентрації 10⁷ КУО/мл – їх висота була, в середньому, на 2,3 см більша за таку у контрольних рослин на 30-ту добу.

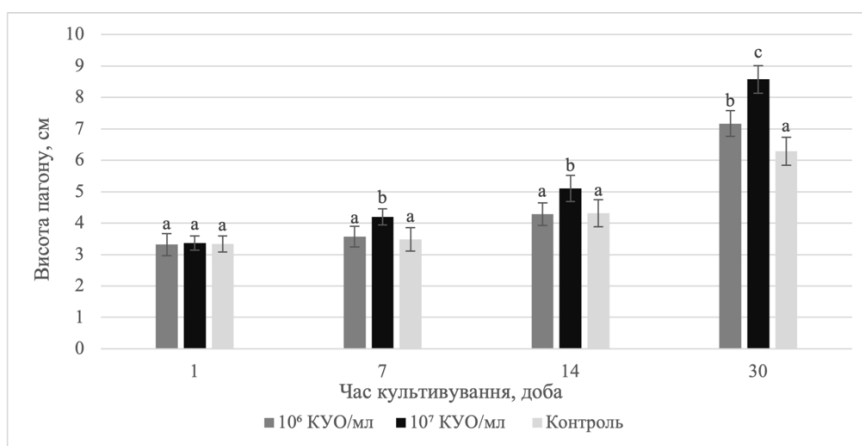


Рис. 5.1.2. Середня висота надземної частини рослин ожини за інокуляції *E. italicus* ONU547

Вже з 7-ї і до останньої доби спостережень бактерії у концентрації 10^7 КУО/мл демонстрували відмінність у впливі на середню висоту рослин як від контролю, так і від концентрації 10^6 КУО/мл.

Хоча *E. italicus* в концентрації 10^6 КУО/мл також показав вплив, але прискорення росту спостерігали із затримкою порівняно до 10^7 КУО/мл бактерій. Суттєву різницю з контролем спостерігали тільки на 30-ту добу спостережень, коли рослини у цій групі були вищими за контрольні, в середньому, на 0,9 см. У свою чергу, від першої до 14-ї доби різниці впливу цієї дослідної групи порівняно з контролем виявлено не було.

Середня кількість вузлів у рослин. Для мікроклонів павловнії бактерії *E. italicus* ONU547 сприяли підвищенню кількості вузлів у рослин з 7-ї доби. Обидві концентрації, використані у досліді, різноманітно відрізнялися за своїм впливом. На 7-му добу спостережень найбільша середня кількість вузлів була у рослин, інокульованих 10^6 КУО/мл *E. italicus*, на 14-ту добу вплив обох концентрацій відмічали як однаковий, а на останню добу найвищу середню кількість виявили мікроклони з 10^7 КУО/мл бактерій – $7,7 \pm 0,5$ вузлів (рис. 5.1.3).

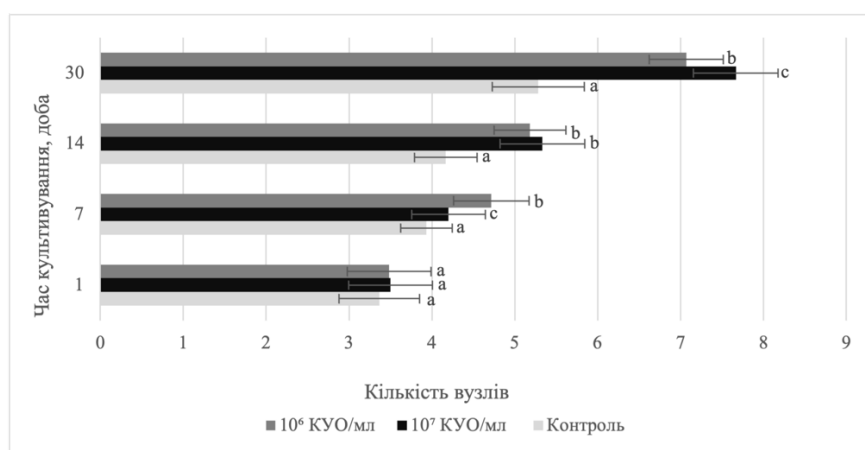


Рис. 5.1.3. Середня кількість вузлів у рослин павловнії за інокуляції *E. italicus* ONU547

Таким чином, бактерії *E. italicus* ONU547 позитивно впливали на показник кількості вузлів у павловнії в обох дослідних концентраціях.

На рис. 5.1.4 показано середню кількість вузлів у рослин ожини трьох експериментальних груп з дня висадки до 30-ї доби спостережень.

З одержаних результатів видно, що кількість вузлів співвідносилась з висотою рослин і також планомірно зростала у часі. Різниця у інокульованих рослин та контролю також ставала більшою протягом 30 днів спостереження. Варто відзначити, що різницю впливу дослідних концентрацій з контролем та між собою також спостерігали з 7-ї і до останньої доби експерименту.

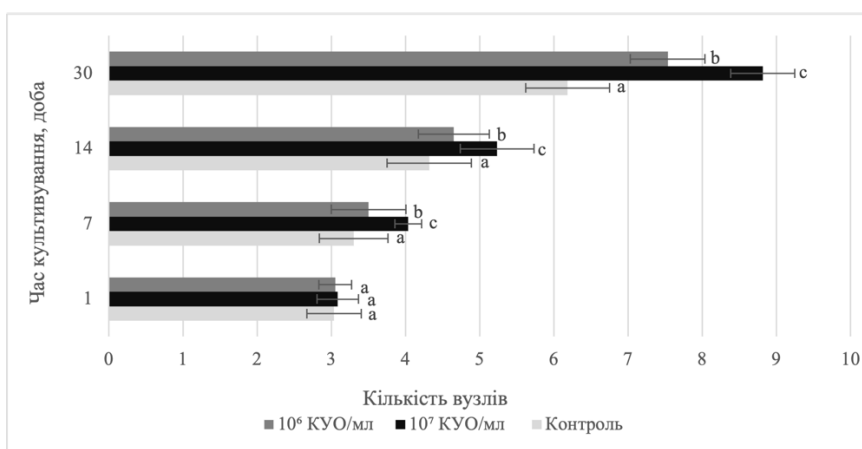


Рис. 5.1.4. Середня кількість вузлів у рослин ожини за інокуляції *E. italicus* ONU547

Найменші показники реєстрували у контрольних рослин протягом усіх 30 діб. Використання 10^6 КУО/мл *E. italicus* сприяло одержанню проміжних результатів – $7,5 \pm 0,5$ вузлів на останній день спостережень, а найбільша кількість вузлів (в середньому, $8,8 \pm 0,4$ вузли на рослину) виявлена у групи рослин з використанням 10^7 КУО/мл бактерій.

Середня площа листа. Різниця між експериментальними та контрольними рослинами як у павловнії, так і у ожини була помітна також і за середнім розміром листа (рис. 5.1.5 та рис 5.1.6).

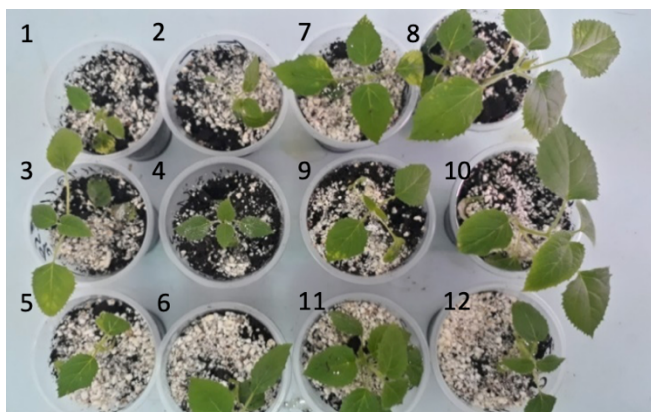


Рис. 5.1.5. Мікроклони павловнії на 14-ту добу адаптації з *E. italicus* ONU547: 1-6 – контроль; 7-12 – рослини, інокульовані бактеріями в концентрації 10^7 КУО/мл

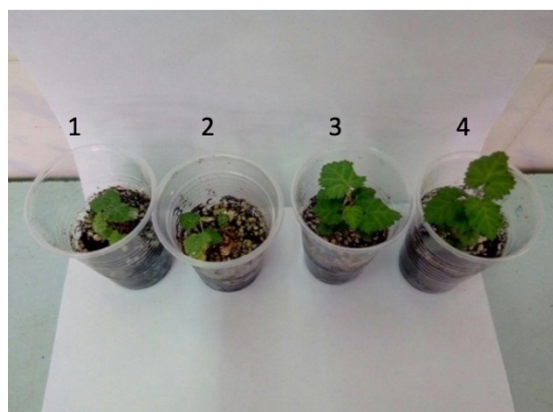


Рис. 5.1.6. Мікроклони ожини на 14-ту добу адаптації з *E. italicus* ONU547: 1, 2 – контроль; 3, 4 – рослини, інокульовані бактеріями в концентрації 10^7 КУО/мл

Бактерії обох дослідних концентрацій сприяли збільшенню середньої площі листа рослин павловнії, але, для цього показника, протягом усіх діб спостережень найвищу середню площу листка реєстрували у мікроклонів, інокульованих 10^7 КУО/мл *E. italicus* (рис. 5.1.7).

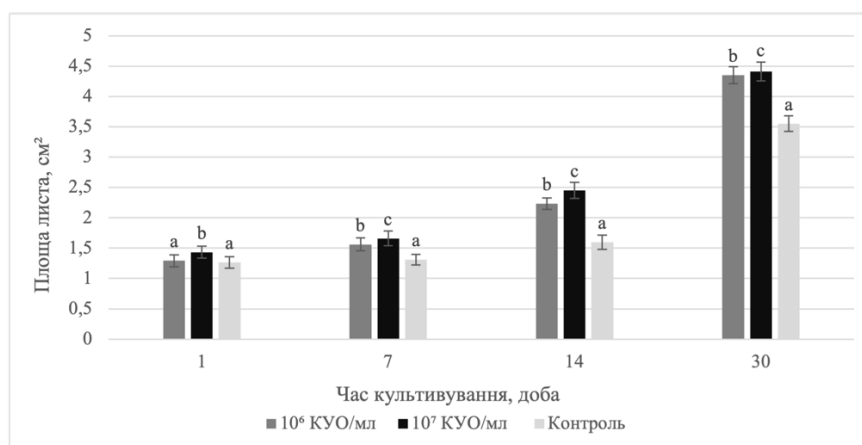


Рис. 5.1.7. Середня площа листа у рослин павловнії за інокуляції *E. italicus* ONU547

Вплив бактерій дослідних концентрацій відрізнявся між собою та від контролю протягом усього експерименту. Хоча, в абсолютних значеннях різниця між впливом *E. italicus* у концентраціях 10^7 та 10^6 КУО/мл була незначною,

статистичний аналіз показав достовірну відмінність між ними. Тому, можна вважати, що найкращий ефект на середню площу листа при інокуляції мікроклонів павловнії показали бактерії *E. italicus* в концентрації 10^7 КУО/мл, що було на $0,8 \text{ см}^2$ більше за контроль.

Заміри середньої площі листа у рослин ожини протягом адаптаційного експерименту показали певні відмінності від контролю. При цьому бактерії обох дослідних концентрацій при інокуляції на останню добу спостережень показали схожі результати (рис. 5.1.8).

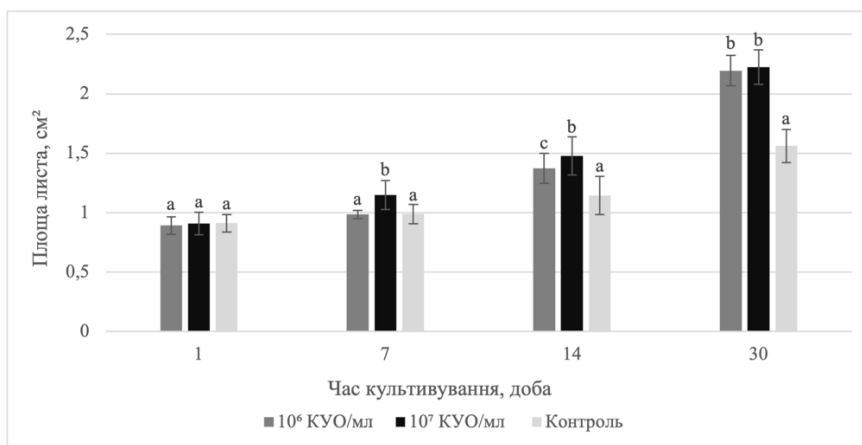


Рис. 5.1.8. Середня площа листа у рослин ожини за інокуляції *E. italicus* ONU547

На 7-му добу адаптації статистично достовірну різницю із контролем у середній площі листа ожини спостерігали лише у групі мікроклонів, адаптованих за інокуляції 10^7 КУО/мл *E. italicus*. На 14-ту добу, вже обидві дослідні групи демонстрували відмінність від контролю та одна від іншої, а на 30-ту добу, середня площа листа дослідних рослин практично зрівнялася та становила на $0,6 \text{ см}^2$ більше за контроль.

Отже, бактерії *E. italicus* ONU547 за інокуляції мікроклонів павловнії та ожини у концентраціях 10^6 та 10^7 КУО/мл позитивно впливали на показники приживлюваності рослин у ґрунті, середньої висоти надземної частини, кількості вузлів та площі листа у порівнянні з контролем, однак, більший ефект в підвищенні адаптації мікроклонів продемонстрували бактерії в концентрації 10^7 КУО/мл.

Спостережувані ефекти бактерій *E. italicus* ONU547 на проростання насіння та на ріст мікроклонованих рослин на етапі адаптації до умов *ex vitro* можуть попередньо бути пояснені низкою причин. Відомо, що *E. italicus* ONU547 є продуцентом органічних кислот, переважно, оцтової (Merlich et al. 2017a), що може бути одним з факторів забезпечення антагонізму до фітопатогенних мікроорганізмів. Також для *E. italicus* ONU547 була встановлена здатність до синтезу бактеріоцину, що суттєво підвищує активність після нагрівання та володіє антагоністичною активністю щодо фітопатогенних бактерій (Merlich et al. 2019).

З попередніх публікацій відомо, що бактерії штаму *E. italicus* ONU547 як частина консорціуму з іншими лактобактеріями можуть утворювати біоплівки на поверхні коренів крес-салату. Така здатність є важливою для більш ефективного проникнення метаболітів бактерій у міжклітинний простір та забезпечення ефективного захисту рослин (Merlich et al. 2017b).

Рістстимулювальні властивості можна теоретично пояснити продукцією фітогормональних речовин, оскільки для ентерококів вже було вивчено такі можливості (Lee et al. 2015), а також, наприклад, переводу нерозчинних фосфатів у ґрунті у доступну для рослин форму, як це вже було показано для ентерококів у іншому дослідженні (Mello et al. 2020). Перевірка цих гіпотез для штаму *E. italicus* ONU547 буде предметом наступних поглиблених досліджень взаємодії цих бактерій та рослин.

5.2. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з бактеріями роду *Bacillus*

На етапі адаптації мікроклонованих рослин до нестерильних умов оточуючого середовища бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 показали позитивний вплив на біометричні показники саджанців, а також на рівень їх приживлюваності у ґрунті порівняно з контролем. Ефект спостерігали на обох дослідних рослинах – павловнії та ожині.

Приживлюваність. Приживлюваність рослин павловнії знаходилася на найвищому рівні за використання бактерій *B. megaterium* ONU500 та *B. velezensis*

ONU553. На 30-ту добу, кількість життєздатних мікроклонів у цих групах була на 17,8% та 16,7% вищою за контроль. Позитивний вплив на цей показник мала також інокуляція бактеріями *B. pumilus* ONU554 та *B. subtilis* ONU559 – у цих рослин на останню добу спостережень приживлюваність була на 10,0% і 12,2% більшою за контроль (табл. 5.2.1).

Таблиця 5.2.1

Середнє значення приживлюваності мікроклонів павловнії та ожини у ґрунті після інокуляції бактеріями роду *Bacillus*

Час культивування, доба	Штам	Приживлюваність мікроклонів павловнії, %	Приживлюваність мікроклонів ожини, %
7	<i>B. megaterium</i> ONU500	97,4±1,7 ^d	83,7±2,3 ^b
	<i>B. velezensis</i> ONU553	91,9±1,3 ^c	88,3±2,8 ^c
	<i>B. pumilus</i> ONU554	87,0±2,3 ^b	83,0±1,7 ^b
	<i>B. subtilis</i> ONU559	89,6±1,7 ^{bc}	84,5±2,2 ^b
	Контроль	82,2±2,2 ^a	69,6±5,3 ^a
14	<i>B. megaterium</i> ONU500	87,8±4,0 ^c	81,9±1,7 ^c
	<i>B. velezensis</i> ONU553	86,7±2,9 ^c	86,7±2,3 ^d
	<i>B. pumilus</i> ONU554	79,3±1,7 ^b	65,9±3,4 ^b
	<i>B. subtilis</i> ONU559	78,5±1,7 ^b	70,4±2,3 ^b
	Контроль	69,6±4,5 ^a	55,2±2,3 ^a

Продовження таблиці 5.2.1

Час культивування, доба	Штам	Приживлюваність мікроклонів павловнії, %	Приживлюваність мікроклонів ожини, %
30	<i>B. megaterium</i> ONU500	83,0±2,8 ^c	77,0±0,6 ^d
	<i>B. velezensis</i> ONU553	81,9±2,8 ^c	84,1±2,8 ^c
	<i>B. pumilus</i> ONU554	75,2±1,3 ^b	61,5±3,6 ^b
	<i>B. subtilis</i> ONU559	77,4±1,3 ^b	69,3±3,4 ^c
	Контроль	65,2±0,6 ^a	52,6±2,8 ^a

У цьому випадку достовірну різницю впливу з контролем та між різними бактеріями спостерігали вже з 7-ї доби культивування. Проте, з 14-ї доби і до останньої ефект 4 штамів бактерій поділявся на 2 групи: *B. pumilus* ONU554 і *B. subtilis* ONU559 з дещо меншими показниками приживлюваності, та *B. velezensis* ONU553 і *B. megaterium* ONU500 – з найбільшими.

Результати обчислень приживлюваності ожини також показали, що, в середньому, на 30-ту добу найбільшу кількість життєздатних спостерігали у групі рослин, інокульованих бактеріями *B. velezensis* ONU553, що дозволило підвищити приживлюваність на 31,5% порівняно з контролем. Інокуляція мікроклонів бактеріями штамів *B. megaterium* ONU500, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 підвищила приживлюваність рослин на останню добу спостережень на 24,4%; 8,9% та 16,7%, відповідно (табл. 5.2.1).

Протягом усіх днів спостережень всі експериментальні групи статистично достовірно відрізнялися від контролю за впливом на приживлюваність рослин ожини, але їх вплив між собою також відрізнявся з плином часу. Наприклад, на 7-му добу спостережень ефект усіх дослідних бактерій, окрім *B. velezensis*

ONU553, був однаковим, на 14-ту добу виділилась група *B. pumilus* ONU554 і *B. subtilis* ONU559, що впливали позитивно, але найменшою мірою, та *B. megaterium* ONU500 і *B. velezensis* ONU553, що забезпечували найвищу приживлюваність. На останню добу, вплив усіх дослідних бактерій чітко відрізнявся як від контролю, так і між собою.

Таким чином, бактерії роду *Bacillus* сприяли підвищенню приживлюваності мікроклонів павловнії та ожини порівняно з контролем.

Середня висота надземної частини рослин. Показано, що бактерії дослідних штамів мали вплив на процеси росту та розвитку рослин. На рис. 5.2.1 та рис. 5.2.2 відображено динаміку приросту середньої висоти рослин павловнії та ожини від дня висадки у ґрунт до 30-ї доби адаптації.

Під час адаптації рослин павловнії було зафіксовано відмінності між контролем та інокульованими бактеріями мікроклонами (рис. 5.2.1).

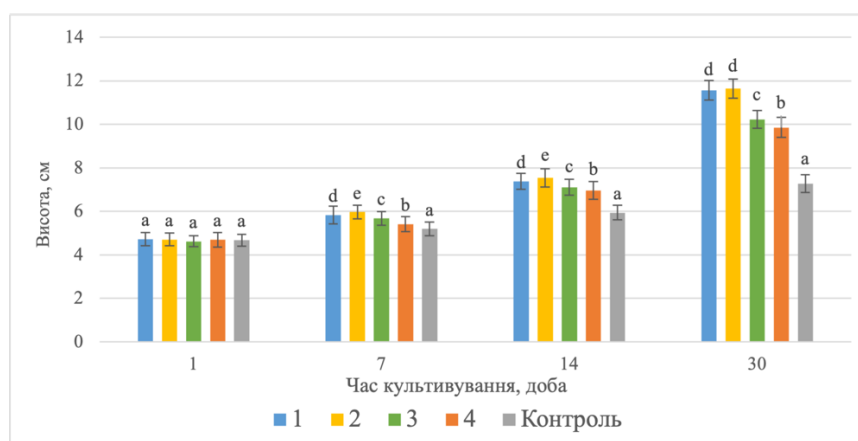


Рис. 5.2.1. Середня висота надземної частини у рослин павловнії під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Рослини, інокульовані бактеріями усіх дослідних штамів, показали більший приріст за контроль протягом усіх днів спостережень, і на 30 добу середня висота рослин павловнії, інокульованих бактеріями *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, становила $11,6 \pm 0,4$ см, $11,6 \pm 0,5$ см, $10,2 \pm 0,4$ см та $9,9 \pm 0,5$ см, відповідно, у той час як контрольні рослини мали середню висоту $7,3 \pm 0,4$ см.

Ефект різних бактерій також статистично достовірно відрізнявся вже з 7-ї доби. А вже на 30-ту добу адаптації дія бактерій *B. velezensis* ONU553 та *B. megaterium* ONU500, що були найкращими за впливом на висоту мікроклонів павловнії, не відрізнялася між собою. Бактерії інших штамів впливали відмінно від контролю та від інших дослідних груп.

З рис. 5.2.2 видно, що середня висота рослин ожини закономірно зростала у часі у всіх експериментальних груп, але найбільший приріст показали мікроклони, що експонували з бактеріями *B. velezensis* ONU553 – їх висота була, в середньому, на 3,7 см більша за таку у контрольних рослин на 30-ту добу.

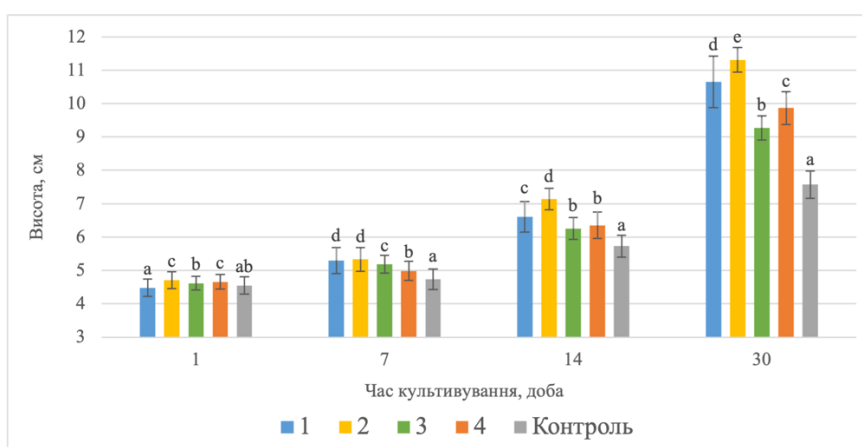


Рис. 5.2.2. Середня висота надземної частини рослин ожини під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Інокуляція бактеріями інших штамів також показала суттєвий позитивний вплив, починаючи від 7-ї доби адаптації рослин у ґрунті і до кінця спостережень. Найменшу середню висоту на останню добу спостережень серед експериментальних рослин мали ті, що інокульовані бактеріями *B. pumilus* ONU554, але і вони були, в середньому, на 1,7 см більші за контроль.

Загалом, протягом усього періоду адаптації експериментальні рослини переважали за висотою контрольні, а також відрізнялися між собою. Ця різниця була дещо неоднорідною у різні дні, та на останню добу спостережень ефект усіх дослідних бактерій на висоту рослин ожини виявився різним.

Отже, бактерії роду *Bacillus* впливали на середню висоту мікроклонів павловнії та ожини порівняно з контролем.

Середня кількість вузлів у рослин. Для мікроклонів павловнії інокуляція бактеріями роду *Bacillus* сприяла підвищенню кількості вузлів у рослин, у даному випадку результати майже повністю аналогічні у обох дослідних видів рослин (рис. 5.2.3).

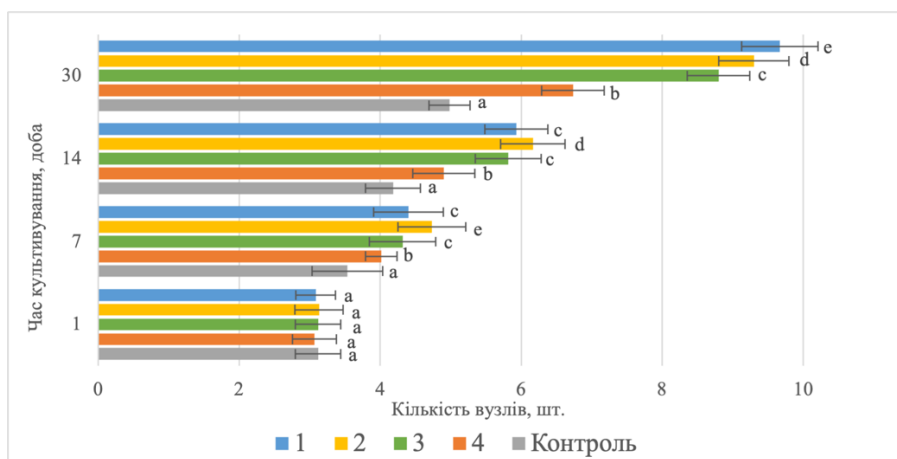


Рис. 5.2.3. Середня кількість вузлів у рослин павловнії під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Усі експериментальні групи відрізнялися від контролю з 7-ї доби адаптації, та більшість із них відрізнялися між собою. На 30-ту добу найбільша середня кількість у павловнії становила $9,7 \pm 0,5$ вузлів, яку відмічали у рослин, інокульованих *B. megaterium* ONU500. Дещо менші значення показника, у середньому, мали рослини, експоновані з бактеріями *B. velezensis* ONU553 – $9,3 \pm 0,5$ вузлів. Найменша середня кількість у мікроклонів павловнії спостерігалася за експозиції з бактеріями *B. subtilis* ONU559 – $6,7 \pm 0,5$ вузлів, але цей показник все ще був більшим за контрольні рослини, у яких, в середньому, було $5,0 \pm 0,4$ вузлів на останню добу спостережень.

На рис. 5.2.4 показано середню кількість вузлів у рослин ожини дослідних груп з дня висадки до 30-ї доби спостережень.

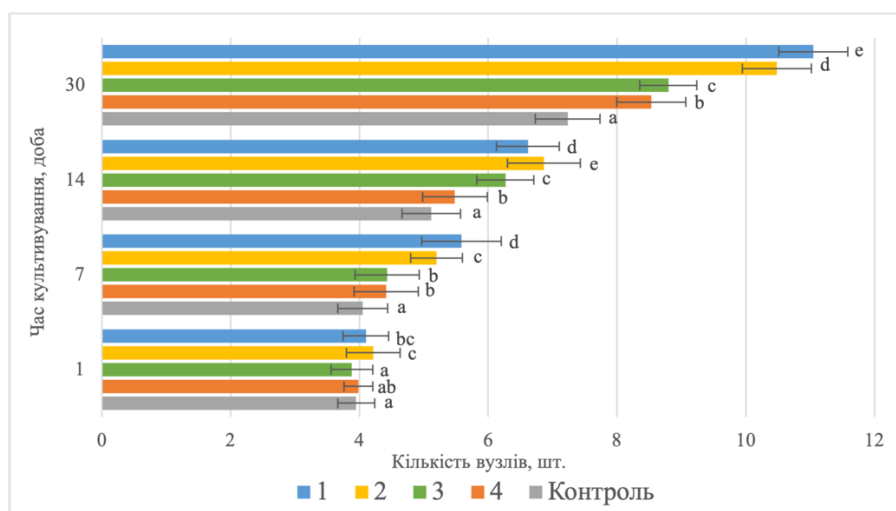


Рис. 5.2.4. Середня кількість вузлів у рослин ожини під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

З наведених результатів видно, що кількість вузлів співвідносилась з висотою рослин, і також планомірно зростала у часі. Різниця у інокульованих рослин та контролю також ставала більшою протягом 30 днів спостереження. Найменші показники реєстрували у контрольних рослин протягом усього експерименту. Використання *B. megaterium* ONU500 сприяло утворенню найбільшої кількості вузлів на рослині на 30-ту добу адаптації – $11,1 \pm 0,5$ вузлів. Бактерії інших дослідних штамів також впливали позитивно у порівнянні з контролем протягом усіх днів спостережень.

Як і у інших випадках, спостерігали статистично достовірну різницю впливу бактерій різних штамів вже з 7-ї доби. Цікаво відмітити, що на 14-ту добу найбільшу кількість вузлів відмічали у рослин, інокульованих *B. velezensis* ONU553, а на 30-ту – *B. megaterium* ONU500.

Отже, бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 при інокуляції коренів мікроклонів позитивно впливали на показник кількості вузлів у павловнії та ожини порівняно з контролем протягом 30 діб адаптації.

Середня площа листа. Різниця між експериментальними та контрольними рослинами як у павловнії, так і у ожини була помітна також і за середнім розміром листа (рис. 5.2.5 та рис. 5.2.6).

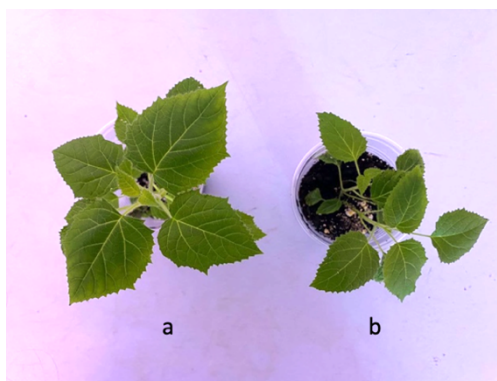


Рис. 5.2.5. Мікроклони павловнії на 14-ту добу адаптації з *B. subtilis* ONU559: а – рослина, інокульована бактеріями; б – контроль

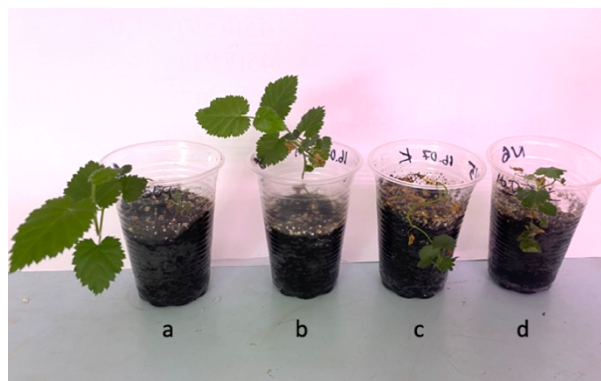


Рис. 5.2.6. Мікроклони ожини на 14-ту добу адаптації з *B. subtilis* ONU559: а, б – рослини, інокульовані бактеріями; с, d – контроль

Заміри середньої площі листа у рослин павловнії протягом адаптаційного експерименту показали суттєві відмінності від контролю. При цьому, різниця з контролем проявилася раніше за усі дослідні варіанти і була найбільшою у рослин, інокульованих бактеріями штаму *B. subtilis* ONU559 (рис. 5.2.7).

При цьому вже з 7-ї доби спостережень в усіх експериментальних групах спостерігалася суттєва різниця з контролем, яка швидко збільшувалася з часом.

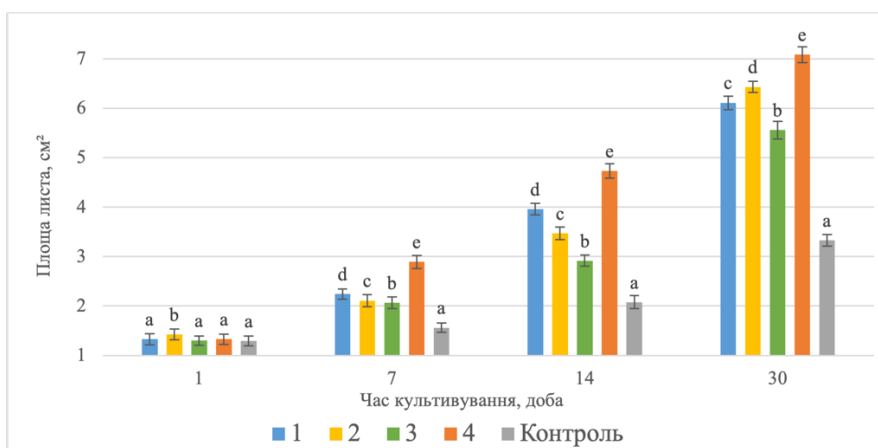


Рис. 5.2.7. Середня площа листа у рослин павловнії під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

Наприклад, у день висадки у ґрунт середня площа листа усіх мікроклонів становила приблизно $1,3 \text{ см}^2$, а на 30-ту добу складала більше $7,0 \text{ см}^2$ для рослин, інокульованих *B. subtilis* ONU559, та більше $5,5 \text{ см}^2$ при використанні штамів *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553 та *B. pumilus* ONU554. Середня площа листа контрольних рослин на останню добу адаптації знаходилася на рівні $3,3 \pm 0,1 \text{ см}^2$. У даному випадку, вплив різних штамів бактерій статистично відрізнявся вже з 7-ї доби спостережень.

При вимірюванні середньої площі листа рослин ожини спостерігали схожий характер впливу – найбільшу середню площу листа реєстрували у рослин, експонованих з *B. subtilis* ONU559 (рис. 5.2.8).

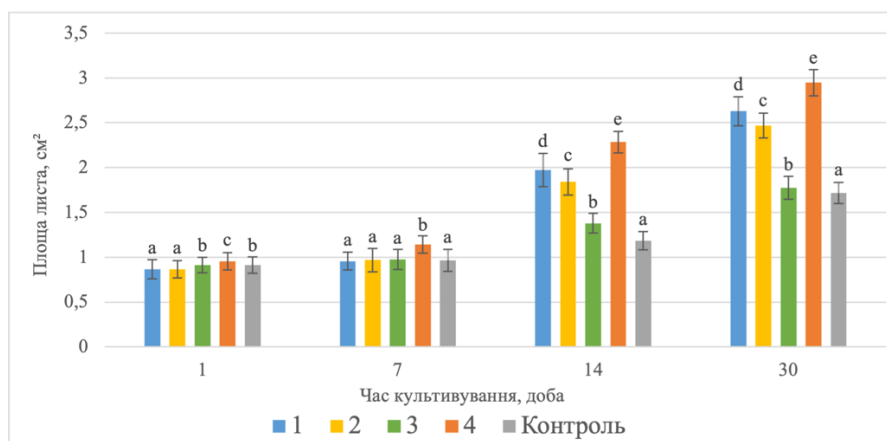


Рис. 5.2.8. Середня площа листа у рослин ожини під час адаптації з бактеріями роду *Bacillus*: 1 – *B. megaterium* ONU500, 2 – *B. velezensis* ONU553, 3 – *B. pumilus* ONU554, 4 – *B. subtilis* ONU559

На 7-му добу адаптації всі експериментальні групи не демонстрували різниці з контролем, окрім мікроклонів, інокульованих *B. subtilis* ONU559. З плином часу ця різниця ставала більшою, і на 30-ту добу середня площа листа цих рослин становила $3,0 \pm 0,1 \text{ см}^2$, у той час як у контролю вона знаходилася на рівні $1,7 \pm 0,1 \text{ см}^2$. З 14-ї доби спостережень і до останньої усі експериментальні

групи мали відмінність від контролю, проте при інокуляції рослин бактеріями штаму *B. pumilus* ONU554 вона була мінімальною. Між собою вплив дослідних бактерій за цим показником відрізнявся з 14-ї доби адаптації.

Отже, інокуляція мікроклонів ожини та павловнії бактеріями *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 у концентрації 10^8 КУО/мл позитивно впливали на показники приживлюваності рослин у ґрунті, середньої висоти надземної частини, кількості вузлів та площі листа у порівнянні з контролем.

Таким чином, наші дослідження поглиблюють наявні дані щодо рістстимулювальних та захисних властивостей бактерій роду *Bacillus*, а також дозволяють визначити доцільність їх використання на етапі адаптації мікроклонованих рослин.

Для *B. megaterium* ONU500 на момент адаптаційних експериментів вже була відома здатність до стимуляції росту рослин: синтез сидерофорів (Защинська 2019), утворення біоплівки на коренях рослин (Мрачківська та ін. 2015), стимулювання росту соняшника та томатів (Babenko et al. 2016b; Швець та ін. 2021), що було підтверджено їх позитивним впливом на мікроклони під час адаптації *ex vitro*. Для інших дослідних штамів бацил подібні властивості були показані вперше як у скринінговому експерименті із крес-салатом *in vitro*, так і в адаптаційних дослідках з мікроклонами.

У цілому, інші дослідження споріднених штамів також демонстрували значну рістстимулювальну здатність. Наприклад, інокуляція рослин арабідопсису бактеріями *B. megaterium* WW1211 стимулювала збільшення біомаси рослин та утворення більшої кількості бокових коренів. Цей ефект пояснено авторами біосинтезом ауксину та регуляцією його розподілу у рослинних тканинах (Wang et al. 2021). У дослідженні Samaras et al. (2021), бактерії *B. subtilis* MBI600 стимулювали ріст томатів, підвищуючи довжину пагонів та коренів. Було встановлено, що мікроорганізми колонізували кореневу систему та стимулювали індуковану систему резистентності рослин, що було доведено методами транскриптоміки (Samaras et al. 2021). Бактерії штаму *B.*

pumilus JPV511 при інокуляції підвищували довжину коренів, пагонів, свіжу та суху вагу, вміст хлорофілу та каротиноїдів у рослин рису навіть в умовах засолення. При цьому була підтверджена здатність цих бактерій до синтезу АЦК-деамінази та ауксинів, а також до солубілізації фосфатів у ґрунті (Kumar et al. 2021).

Для бактерій штамів *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 та *B. subtilis* ONU559 встановлення конкретних механізмів впливу на рослини буде предметом наступних досліджень, проте на даному етапі вже відомий їх антагоністичний ефект на деякі грибкові фітопатогени, що може пояснити значне підвищення рівня приживлюваності інокульованих мікроклонів у ґрунті порівняно до контрольних. За нашими спостереженнями, в умовах адаптаційного боксу саме грибкові ураження стають однією з частих причин загибелі рослин, і, як ми можемо припустити, завдяки інокуляції коренів бактеріями-антагоністами вдається зберегти більшу кількість життєздатних мікроклонів. Також, за непрямыми ознаками впливу, високо вірогідним для дослідних бактерій є синтез речовин фітогормональної природи. На це вказує різноманітність приросту висоти, кількості вузлів, площі листа та додаткових пагонів за інокуляції різними дослідними штамми.

Наші результати щодо дії бактерій роду *Bacillus* на мікроклоновані рослини співвідносяться з даними, отриманими за останні роки при адаптації рослин *Musa spp.* та *Saccharum spp.* з рістстимулювальними бацилами. У цих дослідженнях бактерії підвищували приживлюваність мікроклонів у ґрунті, впливали на висоту рослин, кількість листів, площу листа, а також на різноманітні фізіологічні параметри, як концентрація карбону та хлорофілу, індекс фотосинтезу, проводимість продохів тощо (Silva et al. 2018; Araujo et al. 2021; Michavila et al. 2022). Це свідчить про великий потенціал бактерій роду *Bacillus* як стимуляторів росту рослин та відкриває можливості їх використання на етапі адаптації до умов *ex vitro* після мікроклонального розмноження.

5.3. Адаптація мікроклонів павловнії та ожини з ізолятами актинобактерій

На етапі адаптації мікроклонованих рослин до нестерильних умов оточуючого середовища відібрані 5 ізолятів актинобактерій при інокуляції показали позитивний вплив на біометричні показники саджанців павловнії та ожини, а також на рівень їх приживлюваності у ґрунті порівняно з контролем.

Приживлюваність. Приживлюваність рослин павловнії зростала найбільше при використанні актинобактерій Myt7ch і становила на 30-ту добу $77,2 \pm 1,0\%$, що було на 13,5% вище за контроль. За інокуляції Conc4, Conc32, Lim4 приживлюваність була на 12,4%; 3,0%; 12,4%, відповідно більшою за контроль. Бактерії Conc11 не показали статистично достовірного впливу на цей показник (табл. 5.3.1).

Результати обчислень приживлюваності мікроклонів ожини показали, що, в середньому, на 30-ту добу найбільшу кількість життєздатних рослин спостерігали у групі, в якій мікроклони інокульовали бактеріями Lim4 – $85,0 \pm 1,7\%$, що дозволило підвищити приживлюваність на 34,8% порівняно з контролем. У групі мікроклонів, що експонували з Conc11, Myt7ch, Conc4, Conc32, приживлюваність збільшилася на 3,7%; 19,2%; 20,9%; 27,0%, відповідно на останню добу спостережень (табл. 5.3.1).

Таблиця 5.3.1

Приживлюваність мікроклонованих рослин павловнії та ожини у ґрунті після експозиції з актинобактеріями

Час культивування, доба	Ізолят	Приживлюваність мікроклонів павловнії, %	Приживлюваність мікроклонів ожини %
7	Conc11	$83,3 \pm 1,7^a$	$86,7 \pm 1,7^b$
	Myt7ch	$89,4 \pm 1,7^{bc}$	$86,1 \pm 1,9^b$
	Conc4	$90,6 \pm 1,0^{bc}$	$91,7 \pm 1,7^c$
	Conc32	$87,8 \pm 1,9^b$	$92,8 \pm 1,0^c$
	Lim4	$92,8 \pm 1,9^c$	$100,0 \pm 0,0^d$
	Контроль	$83,7 \pm 1,3^a$	$81,1 \pm 1,0^a$

Продовження таблиці 5.3.1

Час культивування, доба	Ізолят	Приживлюваність мікроклонів павловнії, %	Приживлюваність мікроклонів ожини %
14	Conc11	80,0±1,7 ^b	79,4±1,9 ^b
	Myt7ch	85,0±3,3 ^{cd}	84,4±2,5 ^c
	Conc4	87,2±1,0 ^d	88,33±1,7 ^d
	Conc32	82,2±2,5 ^{bc}	77,2±1,7 ^d
	Lim4	85,0±1,7 ^{cd}	96,7±1,7 ^e
	Контроль	76,1±1,1 ^a	71,7±1,7 ^a
30	Conc11	63,3±1,7 ^a	53,9±2,5 ^b
	Myt7ch	77,2±1,0 ^c	69,4±1,0 ^c
	Conc4	76,1±1,0 ^c	71,1±1,0 ^c
	Conc32	66,7±1,7 ^b	77,2±1,0 ^d
	Lim4	76,1±1,0 ^c	85,0±1,7 ^e
	Контроль	63,7±1,2 ^a	50,2±2,0 ^a

Під час досліджень також відмічали різницю впливу різних ізолятів між собою. При адаптації мікроклонів павловнії, на 7-му добу майже всі ізоляти показали приблизно однаковий рівень впливу, окрім Conc11, що не відрізнявся від контролю. На 14-ту добу вже всі ізоляти відрізнялись від контролю, але різниця їх ефектів між собою була незначною і у багатьох випадках перекривалася. На останню добу, приживлюваність мікроклонів павловнії, інокульованих Conc11, знаходилася на рівні з контролем, окремо виділяли вплив Conc32, що був позитивним, але мінімальним, а ефект від інокуляції бактеріями Myt7ch, Conc4 та Lim4 був найкращим та статистично не відрізнявся.

Під час адаптації мікроклонів ожини виявлено, що на 7-му добу спостережень бактерії Conc11 та Myt7ch впливали однаково, як і ізоляти Conc4,

Conc32. На 14-ту добу – тільки Conc32 та Conc4 мали однаковий рівень впливу, а на 30-ту добу – актинобактерії Myt7ch та Conc4. Протягом усіх днів спостережень за приживлюваністю мікроклонів ожини ефект від інокуляції з Lim4 був кращим не тільки за контроль, але і за всі інші дослідні ізоляти.

Таким чином, використання актинобактерій для інокуляції підвищило приживлюваність мікроклонів павловнії та ожини порівняно з контролем.

Середня висота надземної частини рослин. Показано, що досліджувані ізоляти актинобактерій впливали на ростові процеси у рослин. На рис. 5.3.1 та рис. 5.3.2 відображено динаміку приросту середньої висоти рослин павловнії та ожини від дня висадки у ґрунт до 30-ї доби адаптації.

Під час адаптації рослин павловнії було зафіксовано відмінності між контролем та мікроклонами, інокульованими бактеріями (рис. 5.3.1).

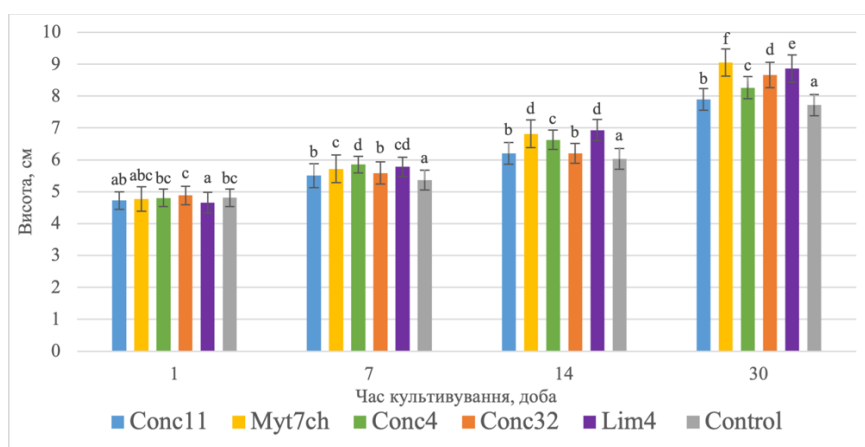


Рис. 5.3.1. Середня висота надземної частини рослин павловнії за інокуляції актинобактеріями

Рослини, експоновані з Myt7ch, показали найбільший приріст пагонів на 30-ту добу експерименту, і на цей день середня висота інокульованих рослин павловнії становила 9,1 см, у той час як контрольні рослини мали середню висоту 7,7 см. Також, за порядком зменшення середніх значень показника, позитивний ефект мали ізоляти Lim4, Conc32, Conc4, Conc11. При цьому, вже з 7-ї доби усі інокульовані рослини відрізнялись за висотою від контролю, а на останню добу спостережень вплив усіх дослідних ізолятів статистично достовірно відрізнявся також і між собою.

На рис. 5.3.2 видно, що середня висота рослин ожини закономірно зростала у часі, але найбільший приріст показали мікроклони, що обробляли бактеріями Myt7ch – їх висота була, в середньому, на 2,0 см більша за таку у контрольних рослин на 30-ту добу.

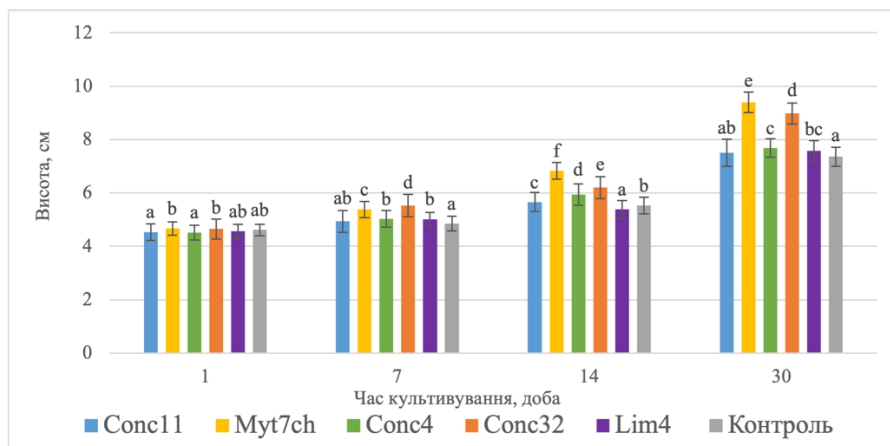


Рис. 5.3.2. Середня висота надземної частини рослин ожини за інокуляції актинобактеріями

Вже з 7-ї і до останньої доби спостережень бактерії Myt7ch демонстрували відмінність у впливі на середню висоту рослин як від контролю, так і від інших актинобактерій. Також високі показники середньої висоти реєстрували у рослин, інокульованих бактеріями Conc32. Інші ізоляти також показали вплив, але у меншій мірі. Conc11 виявив певний вплив на 14-ту добу адаптації, але вже на 30-ту висота цих рослин зрівнялася з контролем.

Середня кількість вузлів у рослин. Для мікроклонів павловнії актинобактерії сприяли підвищенню кількості вузлів у рослин. З 7-ї доби вплив показали ізоляти Conc4, Myt7ch, Lim4. На 14-ту добу, відмінність від контролю показав також ізолят Conc11. На останню добу спостережень, усі мікроклони, інокульовані актинобактеріями, демонстрували позитивний вплив на кількість вузлів у павловнії, а найбільші показники відмічали у ізолятів Lim4 та Myt7ch (рис. 5.3.3).

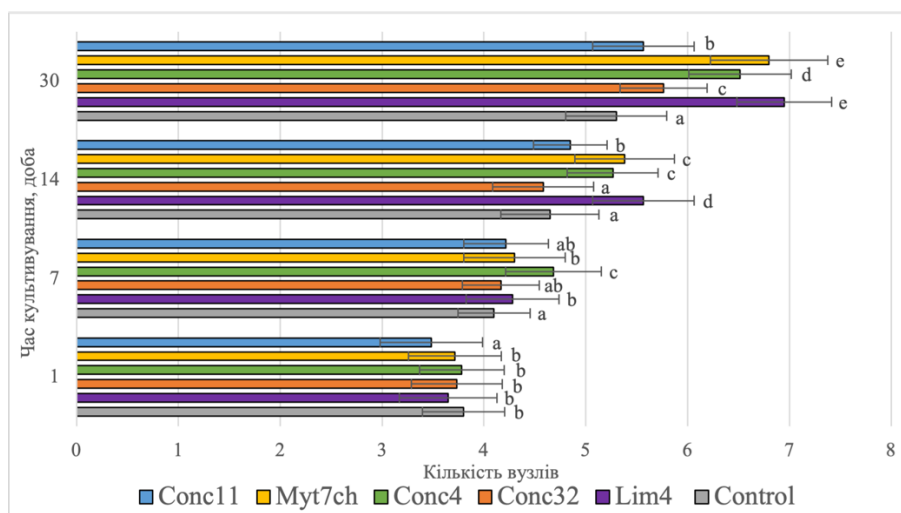


Рис. 5.3.3. Середня кількість вузлів у рослин павловнії за інокуляції актинобактеріями

На рис. 5.3.4 показано середню кількість вузлів у рослин ожини з дня висадки до 30-ї доби спостережень.

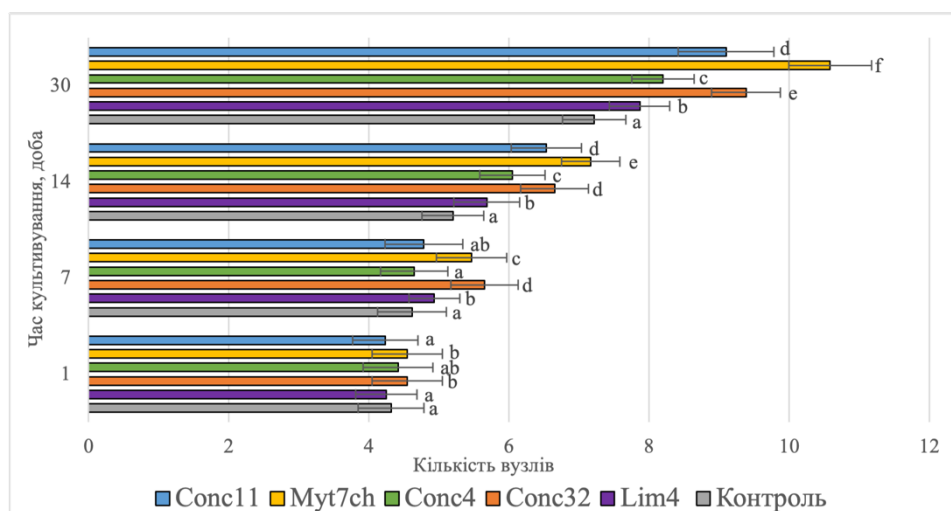


Рис. 5.3.4. Середня кількість вузлів у рослин ожини за інокуляції актинобактеріями

З одержаних результатів видно, що кількість вузлів співвідносилась з висотою рослин, і також планомірно зростала у часі. Різниця у інокульованих рослин та контролю також ставала більшою протягом 30 днів спостереження. Врешті, на останню добу експерименту відмічали вплив усіх дослідних ізолятів на середню кількість вузлів у ожини, що відрізнялися за ступенем впливу не

лише від контролю, але і між собою. Найбільшу кількість на цей період мали мікроклони, інокульовані Myt7ch – $10,6 \pm 0,6$ вузлів.

Таким чином, дослідні актинобактерії позитивно впливали на показник кількості вузлів у павловнії в обох дослідних концентраціях.

Середня площа листа. Різниця між експериментальними та контрольними рослинами була помітна також і за середнім розміром площі листа (рис. 5.3.5 та рис. 5.3.6).

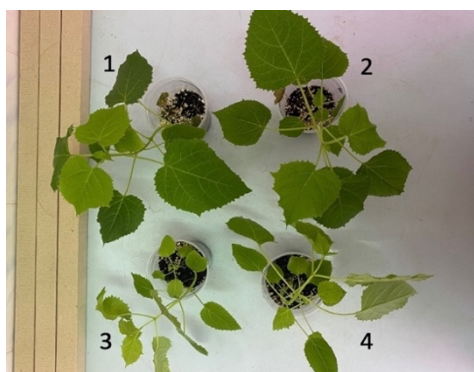


Рис. 5.3.5. Мікроклони павловнії повстяної на 30-ту добу адаптації за інокуляції ізолятом Conс32: 1-2 – інокульовані рослини; 3-4 – контроль

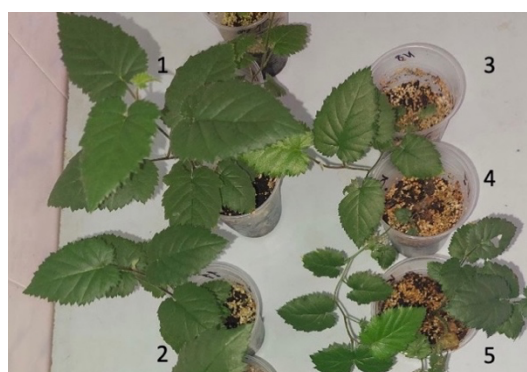


Рис. 5.3.6. Мікроклони ожини на 30-ту добу адаптації за інокуляції ізолятом Conс4: 1-2 – інокульовані рослини; 3-5 – контроль

Бактерії дослідних ізолятів сприяли збільшенню середньої площі листа рослин павловнії, і, для цього показника, протягом усіх днів спостережень найвищу середню площу листа реєстрували у мікроклонів, інокульованих актинобактеріями Conс32 (рис. 5.3.7).

Вплив бактерій ізоляту Conс11 відмічали як негативний на 7-му добу адаптаційного експерименту, але на 14-ту та 30-ту добу показники зрівнялися з контрольними. Актинобактерії Myt7ch показали мінімальний статистично достовірний вплив на середню площу листа павловнії, починаючи з 14-ї доби спостережень.

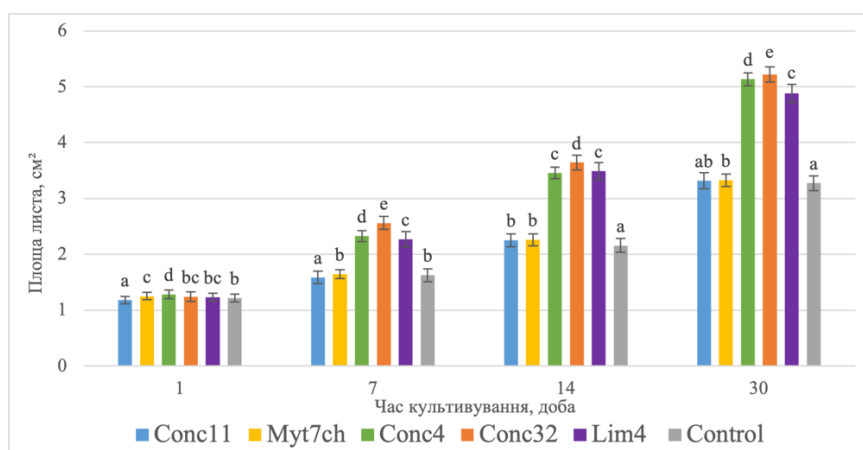


Рис. 5.3.7. Середня площа листа у рослин павловнії за інокуляції актинобактеріями

Ізоляти Conc32, Conc4 та Lim4 демонстрували позитивний вплив на цей показник протягом усіх днів експерименту, та на останню добу він складав на 1,9 см², 1,8 см² та 1,6 см², відповідно, більше за контроль.

Заміри середньої площі листа у рослин ожини протягом адаптаційного експерименту також показали певні відмінності від контролю. При цьому, усі дослідні актинобактерії на останню добу спостережень демонстрували вплив (рис. 5.3.8).

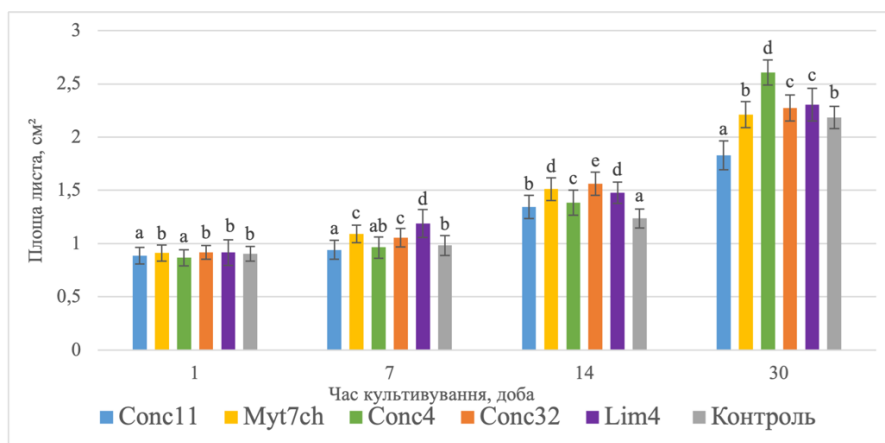


Рис. 5.3.8. Середня площа листа у рослин ожини за інокуляції актинобактеріями

На 7-му добу адаптації статистично достовірну різницю із контролем у середній площі листа ожини спостерігали у груп мікроклонів, адаптованих за

інокуляції Lim4, Myt7ch, Conc32. Для ізоляту Conc11 було відмічено негативний вплив на середню площу листа ожини.

На 14-ту добу, усі дослідні групи демонстрували відмінність від контролю та між собою. А на останню добу спостережень, для рослин, інокулованих Conc11, середній показник на останню добу залишався менше контролю. Площа листа у мікроклонів, експонованих з Myt7ch, зрівнялася з контрольними значеннями. Для Conc32 та Lim4 вона була на одному рівні та більшою за контроль, а найбільша площу листа показали рослини ожини, інокульовані Conc4 – $2,6 \pm 0,1 \text{ см}^2$.

Отже, актинобактерії дослідних ізолятів при інокуляції мікроклонів павловнії та ожини позитивно впливали на показники приживлюваності рослин у ґрунті, середньої висоти пагону, кількості вузлів та площі листа у порівнянні з контролем, однак, більший ефект в підвищенні адаптації мікроклонів продемонстрували бактерії Lim4, Myt7ch, Conc32, Conc4. Але особливості впливу на різні показники у бактерій відрізнялися (Титаренко та ін. 2023).

Так, наприклад, для рослин павловнії актинобактерії ізоляту Conc11 на останню добу спостережень не показали статистично значущого збільшення приживлюваності чи площі листа у порівнянні з контролем, але сприяли підвищенню висоти на 0,2 см та кількості вузлів – на 0,3 вузли.

Використання бактерій ізоляту Myt7ch забезпечило високий рівень приживлюваності мікроклонів (на 13,5% вище за контроль). У цьому варіанті було також найбільш значне серед усіх у досліді збільшення висоти мікроклонів павловнії – на 1,4 см більше за контроль, а кількість вузлів виросла на 1,5 вузли. Вплив на площу листа був мінімальним – вона збільшилась менше, ніж на $0,1 \text{ см}^2$.

Інокуляція актинобактеріями Conc32 покращила приживлюваність мікроклонів на 3,0%, висоту пагону – на 1,0 см, кількість вузлів – на 0,5 вузлів, та площу листа – на $1,9 \text{ см}^2$, що було найбільшою середньою площею листа в експерименті.

У свою чергу, рослини павловнії, інокульовані бактеріями ізоляту Conс4, показали підвищення приживлюваності на 12,4%, висоти пагонів – на 0,6 см, кількості вузлів – на 1,2 вузла, а також середньої площі листа на 1,8 см².

Інокуляція актинобактеріями Lim4 сприяла покращенню приживлюваності адаптованих мікроклонів, що зросла на 12,4%. Рослини павловнії у цьому випадку мали висоту на 1,2 см більше за контроль та кількість вузлів – на 1,7 вузли більше, а площа листа зросла на 1,6 см².

Таким чином, для інокуляції мікроклонів Павловнії повстяної оптимальними є актинобактерії ізолятів Lim4, Myt7ch, Conс32, Conс4. Перспективною є ідея створення консорціуму із цих бактерій для досягнення максимального позитивного ефекту на приживлюваність у ґрунті та біометричні показники мікроклонованих саджанців ожини.

Для рослин ожини актинобактерії ізоляту Conс11 показали невелике підвищення приживлюваності (на 2,7%) та кількості вузлів (на 1,9 вузли), але не вплинули на висоту мікроклонів і продемонстрували зниження показника середньої площі листа адаптованих рослин на 0,3 см² на 30-ту добу адаптації в порівнянні з контролем.

Використання бактерій ізоляту Myt7ch сприяло покращенню приживлюваності адаптованих мікроклонів, що зросла на 19,2%. У цьому варіанті було найбільше серед усіх у досліді збільшення висоти та кількості вузлів мікроклонів ожини – на 2,0 см та 3,4 вузли, відповідно, хоча площа листа на останній день спостережень не відрізнялася від контролю.

Інокуляція актинобактеріями Conс32 покращила приживлюваність мікроклонів на 27,0%, висоту пагону – на 1,6 см, кількість вузлів – на 2,2 вузли, та площу листа – на 0,1 см².

У свою чергу, рослини, інокульовані бактеріями ізоляту Conс4, показали підвищення приживлюваності на 20,9%, висоти пагонів – на 0,3 см, кількості вузлів – на 1,0 вузла, а також найбільшу середню площу листа в експерименті, що на 0,4 см² перевищувала контроль.

Інокуляція актинобактеріями Lim4 забезпечила найвищий рівень приживлюваності мікроклонів (на 34,8% вище за контроль), але мінімально вплинула на інші показники: висота підвищилась на 0,2 см у порівнянні з контролем, кількість вузлів – на 0,7 вузли, а площа листа – на 0,1 см².

Отже, згідно з отриманими результатами, оптимальними для інокуляції мікроклонів ожини є актинобактерії ізолятів Lim4, Myt7ch, Conc32, Conc4.

У даному дослідженні було встановлено потенціал використання ізолятів морських актинобактерій як мікроорганізмів, що сприяють адаптації та стимулюють ріст рослин. Виявлено, що за інокуляції коренів зростали середні показники приживлюваності, висоти пагонів, кількості вузлів, площі листа у адаптованих саджанців протягом 30 діб спостережень порівняно з контролем. У подібних експериментах із мікроклонами Маніоку їстівного (*Manihot esculenta* Crantz), інокуляція рослин на етапі адаптації сумішшю із мікоризних грибів та стрептоміцетів позитивно впливала на азотне живлення рослин, та дозволила знизити використання мінеральних добрив для вирощування – проте, впливу на біометричні показники виявлено не було (Lopes et al. 2019). А в експериментах *in vivo* із пророщування насіння пшениці та кукурудзи, інокульованих актинобактеріями у концентраціях 10^7 – 10^8 КУО/мл, інокульовані проростки обох видів рослин показали більшу довжину коренів, пагонів, більші свіжу та суху вагу (Liu et al. 2019).

Також варто відмітити, що ізолят Conc 11 не проявив суттєвого впливу у дослідях з адаптації мікроклонованих рослин у ґрунті. Бактерії цього ізоляту показали невелике пригнічення росту середньої площі листа адаптованих мікроклонів ожини під час спостережень, та незначно вплинули на рослини павловнії. Дані результати потребують подальших досліджень, але подібні ефекти вже відомі для деяких бактерій, що за певних умов можуть стимулювати ріст рослин, а за інших – пригнічувати його (Nehl et al. 1996). Механізми впливу при цьому дуже різноманітні: синтез летких фітотоксичних речовин, надлишкова продукція фітогормонів, пригнічення формування мікоризи, конкуренція за поживні речовини із рослиною і т.д. Також, важливий у цьому

випадку і видовий чинник – саме для мікроклонів ожини, можливо, актинобактерії ізоляту Conc11 могли виявити пригнічувальний ефект.

Отже, різні дослідження демонструють, що діапазон впливу актинобактерій на рослини є широким, та здебільшого залежить як від умов культивування, особливостей конкретних бактерій-інокулянтів, так і від самої рослини.

Наші результати розширюють досвід використання актинобактерій, виділених із «екстремальних» екологічних ніш, для стимуляції росту та захисту рослин. З опублікованих наукових робіт з цього напрямку можна виділити дослідження Retnowati et al. (2018), де було встановлено, що асоційовані з морськими губками актинобактерії володіють широким спектром корисних для рослин властивостей, як здатність до солюбілізації фосфатів, фіксації азоту, синтез фітогормонів, пригнічення росту певних фітопатогенів. У роботі Rangseeaew et al. (2021), морські бактерії, виділені на високій глибині, позитивно впливали на ріст рослин томату та полегшували реакцію рослин на стрес за вирощування в умовах засоленості ґрунту.

Інокуляція ізолятами актинобактерій Lim4, Myt7ch, Conc32, Conc4 виявилася ефективною для успішної адаптації мікроклонів Ожини звичайної та Павловнії повстяної. Встановлено позитивний вплив визначених ізолятів на мікроклоновані рослини ожини у процесі адаптації до умов *ex vitro*: підвищення приживлюваності мікроклонів у ґрунті на 19,2–34,8%, середньої висоти рослин на 0,3–2,0 см, кількості вузлів – на 1,0–3,4 вузли, площі листа – на 0,1–0,4 см² на 30-ту добу постасептичної адаптації. Позитивний вплив на рослини павловнії було визначено у підвищенні приживлюваності мікроклонів у ґрунті на 3,0–13,5%, висоти рослин на 0,2–1,4 см, кількості вузлів – на 0,3–1,7 вузлів, площі листа – на 0,1–1,9 см² на останню добу спостережень.

За результатами експериментів та аналізу різноманіття можливих механізмів впливу актинобактерій на рослинні тканини, встановлено, що ізоляти Lim4, Myt7ch, Conc32, Conc4 є перспективними для інокуляції мікроклонованих рослин ожини та павловнії на етапі адаптації до умов *ex vitro*.

5.4. Порівняльний аналіз та визначення найефективніших дослідних бактерій для покращення адаптації мікроклонованих рослин

Під час досліджень було відібрано 10 перспективних штамів та ізолятів бактерій, що виявили позитивний вплив на приживлюваність, середню висоту, кількість вузлів та площу листа рослин павловнії та ожини. З метою встановлення найбільш ефективних інокулянтів за кожним аналізованим показником, порівнювали ступінь їх дії на мікроклони за критерієм ефективності. Порівняння проводили окремо для усіх досліджених показників, а ефективність впливу дослідних бактерій оцінювали у відсотках відносно контролю.

5.4.1. Порівняння впливу дослідних бактерій на процеси адаптації мікроклонів павловнії до умов *ex vitro*

Приживлюваність. Усі досліджувані бактерії, окрім ізоляту Conc11, виявили позитивний ефект на приживлюваність рослин павловнії під час адаптації до умов *ex vitro*. Проте, ступінь їх дії суттєво відрізнявся (рис. 5.4.1.1).

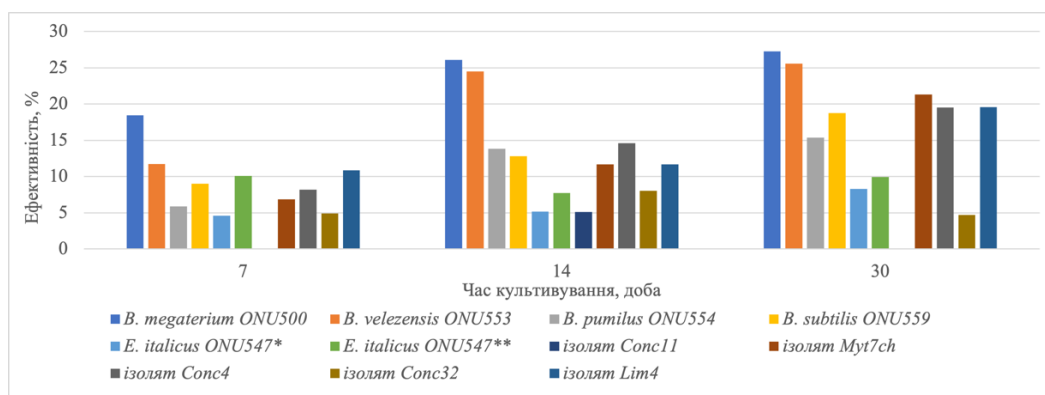


Рис. 5.4.1.1. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на приживлюваність рослин павловнії за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

На 30-ту добу спостережень, найкращий вплив на приживлюваність спостерігався за інокуляції мікроклонів бактеріями *B. megaterium* ONU500 – на 27,3% більше відносно контролю. Також високу ефективність показав *B. velezensis* ONU553 (25,6%) та бактерії ізоляту Myt7ch (21,3%). Інші дослідні

мікроорганізми показали ефективність на рівні від 4,7% до 19,5% краще за контроль.

Висота рослин. У порівнянні з контролем, висота надземної частини мікроклонів павловнії була більшою за експозиції з усіма дослідними бактеріями (рис. 5.4.1.2).

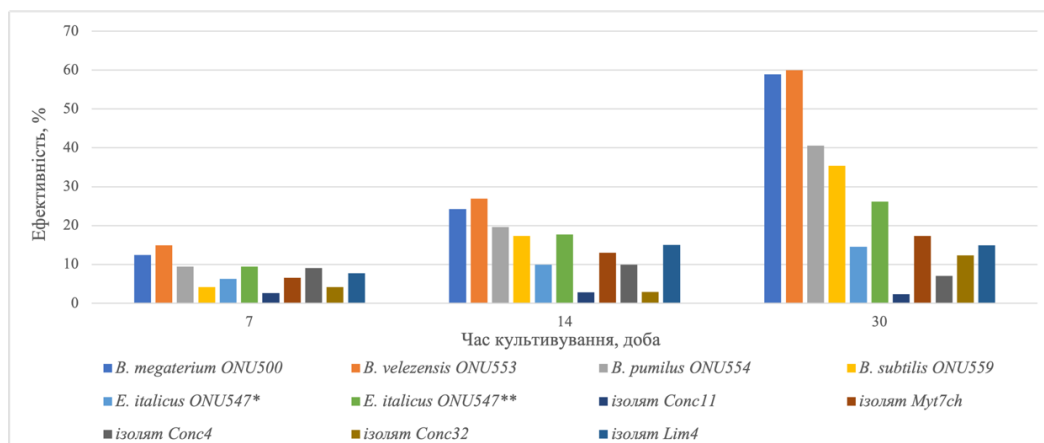


Рис. 5.4.1.2. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на висоту рослин павловнії за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

На останню добу спостережень найвищу ефективність у збільшенні цього показника показав *B. velezensis* ONU553 – на 60,0% краще за контроль. Також високий відсоток ефективності демонстрували бактерії *B. megaterium* ONU500 (58,9%) та *B. pumilus* ONU554 (40,5%). Зазначені бацили показали найвищу ефективність впливу на висоту рослин протягом усіх днів спостережень.

Кількість вузлів. Формування нових вузлів у рослин павловнії в експерименті відбувалося із ефективністю в межах 5,0-94,0% краще за контроль на останню добу спостережень (рис. 5.4.1.3).

Найбільшу ефективність за кількістю вузлів показали бактерії *B. megaterium* ONU500 – на 94,0% краще за контроль.

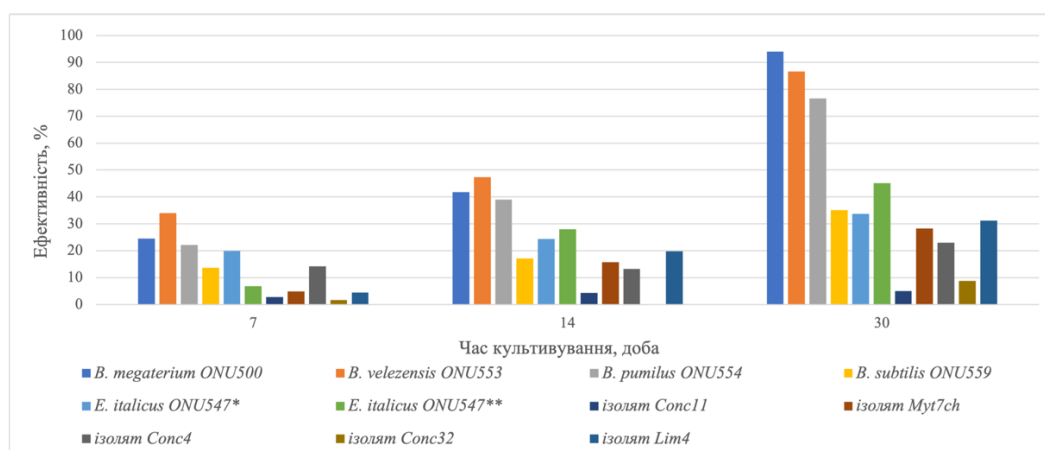


Рис. 5.4.1.3. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на кількість вузлів у рослин павловнії за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

Також, особливо високою ефективністю виділялись *B. velezensis* ONU553 (на 86,6% більше вузлів) та *B. pumilus* ONU554 (на 76,6%).

Площа листа. З рис. 5.4.2.4 видно, що на 30-ту добу усі досліджувані бактерії були ефективними у збільшенні середньої площі листа павловнії, але не усі з них мали позитивний ефект на аналізований показник протягом усіх днів спостережень. Як і у випадку із ожиною, найбільш ефективними на 14-ту та 30-ту доби спостережень виявилися бактерії роду *Bacillus* (рис. 5.4.1.4).

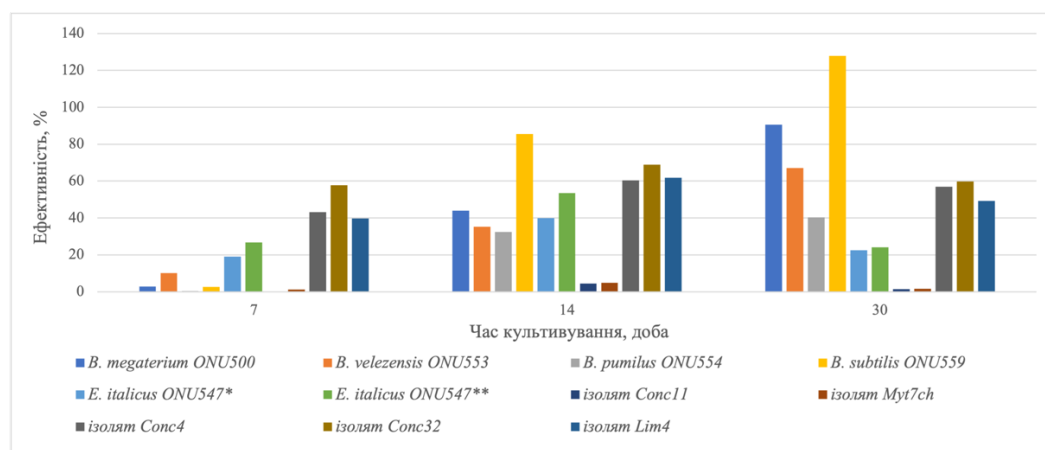


Рис. 5.4.1.4. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на площу листа у рослин павловнії за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

Найкращий ефект показала інокуляція мікроклонів із *B. subtilis* ONU559, що на останню добу забезпечило ефективність на рівні 127,8%. За використання *B. megaterium* ONU500 та *B. velezensis* ONU553 ефективність була також високою – на рівні 90,6% та 67,1%, відповідно. Окремо варто виділити ізолят актинобактерій Conc32 – це єдиний з дослідних мікроорганізмів, що протягом усіх днів спостережень стабільно демонстрував ефективність на 57,6-68,9% краще за контроль.

Таким чином, особливо ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів павловнії були бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, та ізоляти актинобактерій Myt7ch і Conc32. Саме ці мікроорганізми потенційно можуть слугувати основою створення консорціуму бактерій для ефективної адаптації рослин павловнії до умов *ex vitro*.

Для моноінокуляції ризосфери мікроклонів павловнії, у першу чергу, рекомендовано використовувати бактерії штаму *B. megaterium* ONU500 як ті, що впливають на процес адаптації найбільш ефективно.

5.4.2. Порівняння впливу дослідних бактерій на процеси адаптації мікроклонів ожини до умов *ex vitro*

Приживлюваність. Бактерії усіх відібраних штамів в адаптаційних експериментах виявили позитивний ефект на приживлюваність рослин ожини. Проте, ступінь їх дії виявився різним (рис. 5.4.2.1).

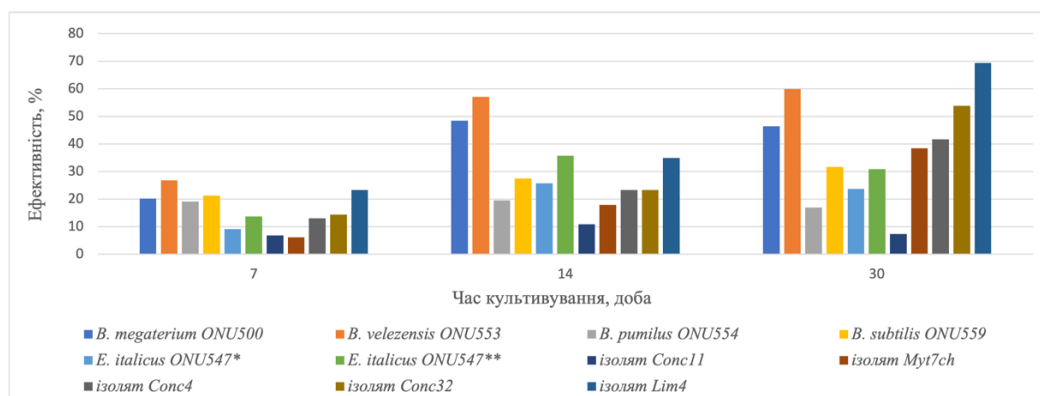


Рис. 5.4.2.1. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на приживлюваність рослин ожини за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

На останню добу спостережень, найкращий вплив на приживлюваність спостерігався за інокуляції мікроклонів актинобактеріями ізоляту Lim4 – на 69,4% більше відносно контролю. Також високу ефективність показали бактерії штаму *B. velezensis* ONU553 (59,9%) та ізоляту Conc32 (53,9%). Варто відмітити, що досліджувані штами бацил виявляли стабільно високу ефективність підвищення приживлюваності вже з 7-ї доби адаптації, що вирізняло їх від більшості випробуваних актинобактерій, що почали демонструвати високу ефективність ближче до кінця періоду спостережень.

Висота рослин. У порівнянні з контрольними рослинами, висота надземної частини мікроклонів була більшою за експозиції з усіма дослідними бактеріями (рис. 5.4.2.2).

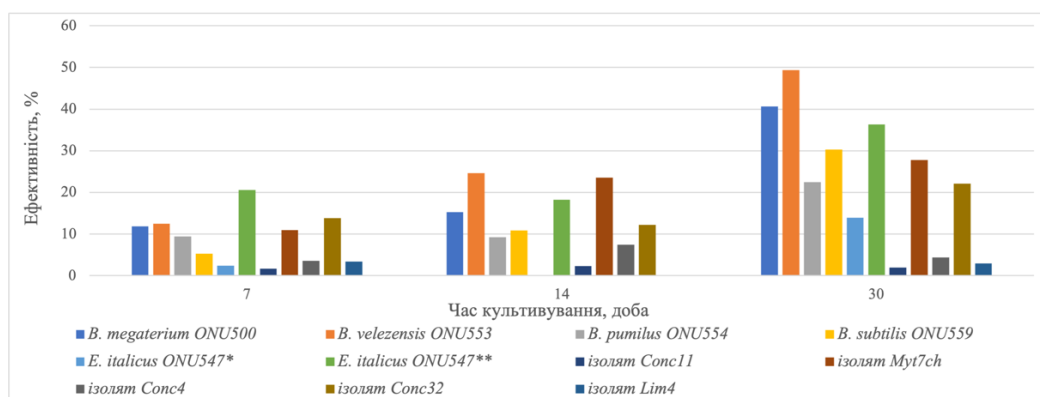


Рис. 5.4.2.2. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на висоту рослин ожини за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

На 30-ту добу найбільше відсоткове співвідношення з контролем показав варіант досліду з використанням *B. velezensis* ONU553 – на 49,4% ефективніше. Дуже висока ефективність була також у *B. megaterium* ONU500 (40,7%) та *E. italicus* ONU547 10^7 КУО/мл (36,3%). Зазначені штами бацил та ентерококу

демонстрували високу ефективність впливу на висоту рослин протягом усіх днів спостережень.

Кількість вузлів. Ефективність формування нових вузлів у рослин в експерименті коливалася в межах 13,6%-52,8% на останню добу спостережень (рис. 5.4.2.3).

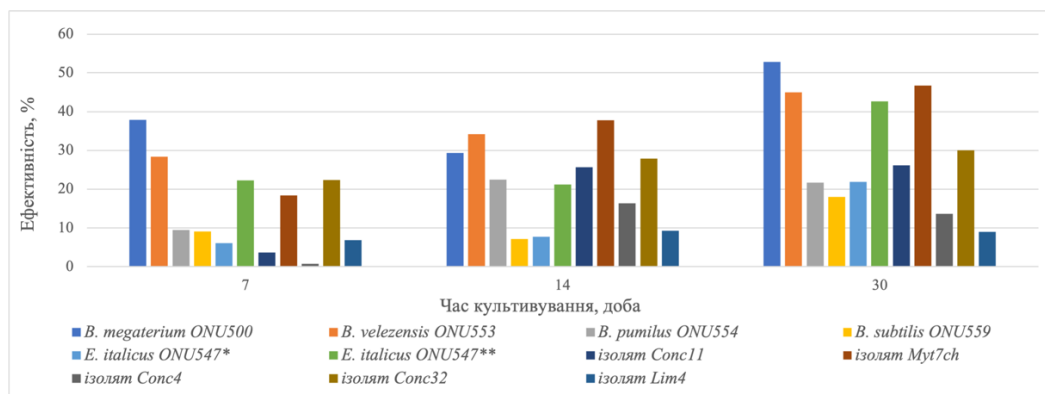


Рис. 5.4.2.3. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на кількість вузлів у рослин ожини за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

Найбільшу ефективність за цим показником продемонстрували бактерії *B. megaterium* ONU500 – на 52,8% більше за контроль. Також, за ефективністю особливо можна виділити ізолят Myt7ch (на 46,7%) та *B. velezensis* ONU553 (на 44,9%).

Площа листа. З рис. 5.4.1.4 видно, що не всі дослідні бактерії мали високоефективний позитивний вплив на середню площу листа мікроклонів ожини, а, особливо, на сьомий день адаптації. Проте, найбільш ефективними на 14-ту та 30-ту доби спостережень виявилися бактерії роду *Bacillus* (рис. 5.4.2.4).

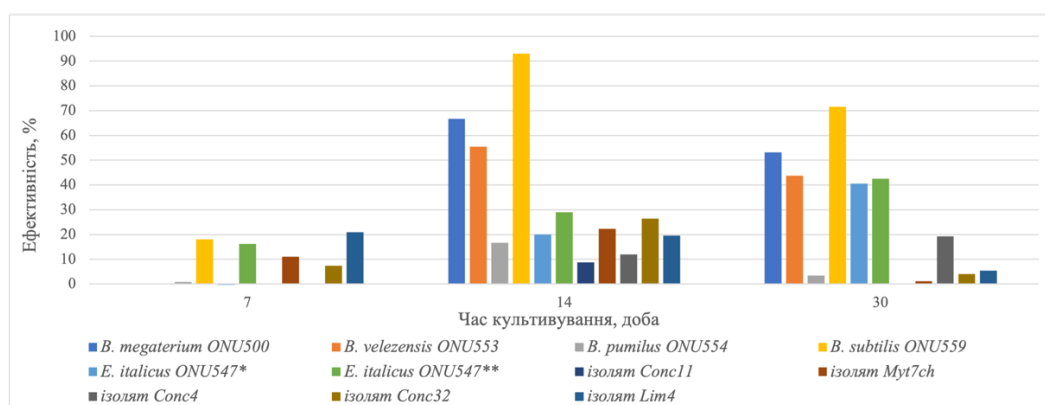


Рис. 5.4.2.4. Порівняння впливу інокуляції дослідними бактеріями на площу листа у рослин ожини за критерієм ефективності (позначення: * – концентрація 10^6 КУО/мл, ** – концентрація 10^7 КУО/мл)

Таким чином, найбільший ефект забезпечувала інокуляція мікроклонів з *B. subtilis* ONU559, що на останню добу забезпечило ефективність на рівні 71,7%. За використання *B. megaterium* ONU500 та *B. velezensis* ONU553 ефективність була також дуже високою – на рівні 53,1% та 43,8%, відповідно. Близько за ефективністю до трьох найкращих штамів бактерій виявився *E. italicus* ONU547 у концентрації 10^7 КУО/мл – на 42,5% ефективніше за контроль на 30-ту добу постасептичної адаптації.

Отже, особливо ефективними для успішної адаптації мікроклонів ожини *ex vitro* виявилися бактерії *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547 у концентрації 10^7 КУО/мл, та ізоляти актинобактерій Lim4, Conc32, Myt7ch. Саме ці мікроорганізми потенційно можуть слугувати основою створення консорціуму бактерій для ефективного подолання адаптаційного стресу у рослин ожини.

Для моноінокуляції ризосфери мікроклонів ожини, у першу чергу, рекомендовано використовувати бактерії штаму *B. velezensis* ONU553 як ті, що впливають на процес адаптації найбільш ефективно.

РОЗДІЛ 6. РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ПРАКТИЧНОМУ ЗАСТОСУВАННЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Згідно з результатами, висвітленими у розділах 3-4, та порівняльним аналізом впливу дослідних бактерій на процеси постасептичної адаптації мікроклонів павловнії та ожини у розділі 5, нами запропоновано удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу зазначених рослин шляхом мікроклонального розмноження та надано наступні практичні рекомендації:

1. Для поверхневої стерилізації експлантів павловнії рекомендовано використовувати фунгіцидний препарат Хорус (1,4 г/л), для експлантів ожини – препарат Скор (1 мл/л) з метою зниження ступеня грибкової контамінації та підвищення приживлюваності.
2. На етапі введення в культуру *in vitro* рекомендовано додавати у склад середовища МС аскорбінову кислоту у концентрації 50 мг/л – для павловнії, та 100 мг/л – для ожини з метою підвищення приживлюваності, прискорення проліферації та покращення біометричних показників.
3. Під час введення в культуру *in vitro* рекомендовано використовувати або напіврідке агаризоване середовище із 0,4% агару, або середовище із 7% кукурудзяного крохмалю у ролі желуючого агенту, що позитивно впливає на строки проліферації, приживлюваність та біометричні характеристики рослин у порівнянні з культивуванням на твердому агаризованому середовищі із 0,8% агару.
4. На етапі стерильного живцювання рекомендовано використовувати наступні співвідношення регуляторів росту для отримання найбільшої кількості сформованих пагонів та вузлів: для павловнії – 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК, для ожини – 1,5 мг/л БАП+0,5 мг/л НОК. Також, на цьому етапі рекомендовано використання кукурудзяного крохмалю (7%) як альтернативного економічного желуючого агенту для живцювання павловнії та ожини.

5. На етапі укорінення *in vitro* мікроклонів павловнії також рекомендоване використання 7% кукурудзяного крохмалю як альтернативи більш вартісному агару.
6. На етапі адаптації до умов *ex vitro* рекомендована моноінокуляція ризосфери мікроклонів павловнії бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500; мікроклонів ожини – бактеріями штаму *B. velezensis* ONU553.

Нижче наведено детальні удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу дослідних рослин шляхом мікроклонального розмноження.

6.1. Удосконалена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження павловнії

Садивний матеріал павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. є кінцевим продуктом даної технології. Оскільки павловнія поки що не є сталою господарською культурою в Україні, офіційні стандарти для саджанців ще не були розроблені. На основі нашого досвіду із висаджування мікроклонально розмнужених саджанців до відкритого ґрунту, ми встановили такі вимоги для садивного матеріалу:

- відсутність зовнішніх пошкоджень, ознак захворювань;
- сортова чистота на рівні 100%
- висота пагону – 20 см і більше;
- кількість вузлів – не менше 5;
- коренева система саджанця повністю утримує субстрат.

Основою для отримання садивного матеріалу є донорні рослини, вирощувані в умовах відкритого ґрунту. Окрім цього, для біотехнологічного процесу необхідна наступна сировина: хімічні реактиви для приготування середовищ, вода (водопровідна та дистильована), ґрунт універсальний, агроперліт, контейнери для вирощування рослин *ex vitro* та *in vitro*, культури необхідних бактерій та колби або пробірки для їх культивування.

Рекомендована біотехнологічна схема мікроклонального розмноження павловнії представлена на рис. 6.1.1.



Рис. 6.1.1. Удосконалена розширена технологічна схема отримання садивного матеріалу павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. шляхом мікроклонального розмноження. Фіолетовим кольором позначено основні процеси, що ведуть до отримання садивного матеріалу; зеленим – запропоновані удосконалення цих процесів; жовтим – сировину, реагенти, допоміжні матеріали; рожевим – відходи виробництва; червоним – готовий цільовий продукт

Схема складається із наступних стадій:

- 1) Приготування та стерилізація живильних середовищ. Середовища готуються вручну в умовах лабораторії із заздалегідь підготовлених маточних розчинів макросолей, мікросолей, хелатованого заліза, вітамінів, фітогормонів. Конкретний склад усіх компонентів залежить від етапу мікроклонування. Середовище розливають у контейнери або скляні ємності для культивування рослин, закривають та автоклавують при 0,5 атм 40 хв. За потреби, процес приготування може бути автоматизовано.
- 2) Поверхнева стерилізація експлантів. Здійснюється за наступною схемою: 10 хв – промивання у мильному розчині, 20 хв – у розчині протигрибкового препарату Хорус 1,4 г/л, 8 хв – витримування у 5% розчині гіпохлориту натрію, 5 хв – обробка 0,05% розчином хлоргексидину диглюконату. Після кожного етапу обробки експланти відмивають двічі у стерильній дистильованій воді, а після останнього – тричі.
- 3) Введення рослинних експлантів культуру *in vitro*. Донорні пагоні розрізають на одновузлові сегменти та культивують на стерильному середовищі МС для введення із додаванням 1 мг/л БАП, 50-100 мг/л аскорбінової кислоти, 7% кукурудзяного крохмалю (або 0,4% агару) як желуючого агента. Культивування здійснюється 25-35 діб в умовах культуральної кімнати при +24-26 °С, інтенсивності освітлювання 2000 лк, відносній вологості 56-70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч.
- 4) Стерильне живцювання. В асептичних умовах ламінарного боксу утворені під час введення в культуру пагони розрізають на живці з пересаджуванням на середовище МС для культивування із додаванням 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК та 0,8% агару або 7% кукурудзяного крохмалю. На даному етапі виконують до 4 циклів живцювання для отримання достатньої кількості мікроклонованих саджанців для адаптації. Паралельно здійснюють введення в культуру нових експлантів із донорних рослин. Культивування живців відбувається за тих самих умов, що і на попередньому етапі, середня тривалість одного циклу – 30 діб. Використані середовища піддаються

утилізації, скляний лабораторний посуд та інструменти миються, стерилізуються у сухожаровій шафі та використовуються багаторазово.

- 5) Укорінення мікроклонів *in vitro*. В останньому перед адаптацією циклі живцювання рослини пересаджуються на середовище МС для укорінення, що є базовим середовищем МС із половинним складом солей та вітамінів, сахарозою у концентрації 10 г/л, 0,8% агару (або 7% кукурудзяного крохмалю чи 3% гуарової камеді) та без додавання фітогормонів. Умови культивування на даному етапі не змінюються, тривалість укорінення складає, в середньому, 14 діб. Лабораторний посуд та інструмент миється, стерилізується та використовується повторно, а відпрацьоване середовище піддається утилізації.
- 6) Переадаптаційний етап. За 5 діб до висадки у ґрунт, у кришках ємностей з мікроклонами роблять отвори (перші три дні діаметр отвору – 0,5 см, інші два дні – 1,0 см) для встановлення газообміну із атмосферою.
- 7) Підготовка бактеріального інокуляту. За добу до стадії постасептичної адаптації, на рідкому середовищі LB вирощують бактерії *B. megaterium* ONU500 при 28 °C протягом 24 год, після чого центрифугують 30 хв при 3500 g, відмивають двічі у стерильній воді та в день висадки рослин у ґрунт готують водну суспензію клітин для інокуляції концентрацією 10^8 КУО/мл.
- 8) Адаптація мікроклонів до умов *ex vitro*. Готують ґрунтову суміш: 90% ґрунту «Універсальний» з додаванням річкового піску, та 10% агроперліту. Підготовлений ґрунт стерилізують 40 хв при 1 атм. Пластикові ємності для висадки рослин ополіскують 3,5% розчином гіпохлориту натрію, а потім – стерильним дистиллятом та висушують. Мікроклони виймають з культурального посуду, а корені стерильною водою відмивають від залишків живильного середовища. На одну годину корені рослин замочують у суспензії бактерій *B. megaterium* ONU500, після чого висаджують мікроклони у пластикові стакани об'ємом 200 мл. На перший тиждень адаптації рослини накриваються поліетиленовою плівкою, потім її знімають. Полив здійснюють двічі на тиждень стерильним дистиллятом

перші 14 днів, а потім – звичайною водопровідною водою. Умови адаптаційної кімнати – температура +22-24 °С, інтенсивність освітлення 2000-2500 лк, відносна вологість 55-70% та фотоперіод 16 год – день, 8 год – ніч. Період адаптації триває до 30 діб.

- 9) Дорощування у контейнерах об'ємом 0,5 л. Рослини разом із ґрунтом із попередньої ємності пересаджують у горщики більшого розміру (0,5 л) та дорощують ще місяць за тих самих умов, що і на попередньому етапі, до досягнення висоти 20 см та більше, і 5 вузлів та більше.

Повний цикл отримання саджанців павловнії за даною схемою можна провести за 4,5 місяці. З урахуванням додаткових циклів живцювання – за 8 місяців.

Нижче представлено розрахунки коефіцієнта розмноження за використання удосконаленої біотехнології мікроклонування рослин павловнії у перерахунку на 1 донорний експлант. Розрахунки виконано для 4 циклів живцювання в культурі *in vitro* на основі експериментальних даних, що було отримано у наших дослідках та представлено у підрозділах 3.1-3.6 та 5.1-5.3.

Таким чином, за удосконаленою біотехнологією мікроклонального розмноження павловнії коефіцієнт розмноження дорівнює:

- 1) на стадії введення в культуру *in vitro*: 4,3 живця на 1 донорний експлант;
- 2) на стадії стерильного живцювання: 4,3 живця з попереднього етапу \times 2,0 пагонів на живці \times 3,5 вузла на кожному пагоні \times 4 цикли = 120 мікроклонів;
- 3) на стадії укорінення в культурі *in vitro*: 112 мікроклонів \times 0,93 (відсоток укорінених) = 112 рослин;
- 4) на стадії адаптації до умов *ex vitro*: 112 рослин \times 0,83 (відсоток успішно адаптованих) = 93 адаптовані саджанці на 1 ініціальний експлант.

Отже, завдяки використанню запропонованої біотехнологічної схеми мікроклонування павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. із 4 циклами стерильного живцювання можна за 8 місяців з одного ініціального експланта отримувати 93 одиниці генетично однорідного адаптованого садивного матеріалу.

6.2. Удосконалена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження ожини

Кінцевим продуктом цієї технології є садивний матеріал ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі. За стандартом, розробленим у 2018 році Радою Асоціації «Укрсадпром» (ТУ У 01.3-40375245-001:2018), рослини не повинні мати зовнішніх пошкоджень, візуальних ознак вірусних захворювань, коренева система саджанців має повністю утримувати субстрат, та цей субстрат не має бути контаміновано шкідниками чи бур'янами. Сортowa чистота має зберігатися на рівні 98-100%. Щодо висоти саджанців цей стандарт не має чітких вимог, тому ми, як додаток до вище перелічених пунктів, самостійно встановили необхідні зовнішні характеристики садивного матеріалу ожини:

- висота надземної частини – не менше 18 см;
- кількість вузлів – не менше 10.

Джерелом для виробництва саджанців є донорні рослини, закуплені у постачальника сортового матеріалу. Окрім цього, для біотехнологічного процесу необхідна така сировина: хімічні реактиви для приготування середовищ, вода (водопровідна та дистильована), ґрунт універсальний, агроперліт, контейнери для вирощування рослин *ex vitro* та *in vitro*, культури необхідних бактерій та колби або пробірки для їх культивування.

Рекомендована нами біотехнологічна схема мікроклонального розмноження ожини представлена на рисунку 6.2.1. Вона складається із наступних стадій:

- 1) Приготування та стерилізація живильних середовищ. Середовища готуються вручну в умовах лабораторії із заздалегідь підготовлених маточних розчинів макросолей, мікросолей, хелатованого заліза, вітамінів, фітогормонів. Конкретний склад усіх компонентів залежить від етапу мікроклонування. Середовище розливають у контейнери або скляні ємності для культивування рослин, закривають та автоклавують при 0,5 атм 40 хв. За потреби, процес приготування може бути автоматизовано.



Рис. 6.2.1. Удосконалена розширена технологічна схема отримання садивного матеріалу ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі шляхом мікроклонального розмноження. Фіолетовим кольором позначено основні процеси, що ведуть до отримання садивного матеріалу; зеленим – запропоновані удосконалення цих процесів; жовтим – сировину, реагенти, допоміжні матеріали; рожевим – відходи виробництва; червоним – готовий цільовий продукт

- 2) Поверхнева стерилізація експлантів. Здійснюється за наступною схемою: 10 хв – промивання у мильному розчині, 20 хв – у розчині протигрибкового препарату Скор 1 мл/л, 8 хв – витримування у 5% розчині гіпохлориту натрію, 5 хв – обробка 0,05% розчином хлоргексидину диглюконату. Після кожного етапу обробки експланти відмивають двічі у стерильній дистильованій воді, а після останнього – тричі.
- 3) Введення рослинних експлантів культуру *in vitro*. Донорні пагони розрізають на одновузлові сегменти та культивують на стерильному середовищі МС для введення із додаванням 1 мг/л БАП, 100 мг/л аскорбінової кислоти, 0,4% агару (або 7% кукурудзяного крохмалю) як желуючого агента. Культивування здійснюється 25-35 діб в умовах культуральної кімнати при +24-26°C, інтенсивності освітлювання 2000 лк, відносній вологості 56-70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч.
- 4) Стерильне живцювання. В асептичних умовах ламінарного боксу утворені під час введення в культуру пагони розрізають на живці з пересаджуванням на середовище МС для культивування із додаванням 1,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК та 0,8% агару або 7% кукурудзяного крохмалю. На даному етапі виконують до п'яти циклів живцювання для отримання достатньої кількості мікроклонованих саджанців для адаптації. Паралельно здійснюють введення в культуру нових експлантів із донорних рослин. Культивування живців відбувається за тих самих умов, що і на попередньому етапі, середня тривалість одного циклу – 30 діб. Використані середовища піддаються утилізації, скляний лабораторний посуд та інструмент миються, стерилізуються у сухожаровій шафі та використовуються багаторазово.
- 5) Укорінення мікроклонів *in vitro*. В останньому перед адаптацією циклі живцювання рослини пересаджуються на середовище МС для укорінення, що є базовим середовищем МС із половинним складом солей та вітамінів, сахарозою у концентрації 10 г/л, 0,8% агару та без додавання фітогормонів. Умови культивування на даному етапі не змінюються, тривалість укорінення складає, в середньому, 20 діб. Лабораторний посуд та

інструмент миється, стерилізується та використовується повторно, а відпрацьоване середовище піддається утилізації.

- 6) Переадаптаційний етап. За 5 діб до висадки у ґрунт, у кришках ємностей з мікроклонами роблять отвори (перші три дні діаметр отвору – 0,5 см, інші два дні – 1,0 см) для встановлення газообміну із атмосферою.
- 7) Підготовка бактеріального інокуляту. За добу до стадії постасептичної адаптації, на рідкому середовищі LB вирощують бактерії *B. velezensis* ONU553 при 28 °C протягом 24 год, після чого центрифугують 30 хв при 3500 g, відмивають двічі у стерильній воді та в день висадки рослин у ґрунт готують водну суспензію клітин для інокуляції концентрацією 10^8 КУО/мл.
- 8) Адаптація мікроклонів до умов *ex vitro*. Готують ґрунтову суміш: 90% ґрунту «Універсальний» з додаванням річкового піску, та 10% агроперліту. Підготовлений ґрунт стерилізують 40 хв при 1 атм. Пластикові ємності для висадки рослин ополіскують 3,5% розчином гіпохлориту натрію, а потім – стерильним дистилятом, та висушують. Мікроклони виймають з культурального посуду, а корені стерильною водою відмивають від залишків живильного середовища. На одну годину корені рослин замочують у суспензії бактерій *B. velezensis* ONU553, після чого висаджують мікроклони у пластикові стакани об'ємом 200 мл. На перший тиждень адаптації рослини накриваються поліетиленовою плівкою, потім її знімають. Полив здійснюють двічі на тиждень стерильним дистилятом перші 14 днів, а потім – звичайною водопровідною водою. Умови адаптаційної кімнати – температура +22-24 °C, інтенсивність освітлення 2000-2500 лк, відносна вологість 55-70% та фотоперіод 16 год – день, 8 год – ніч. Період адаптації триває до 30 діб.
- 9) Дорощування у контейнерах об'ємом 0,5 л. Рослини разом із ґрунтом із попередньої ємності пересаджують у горщики більшого розміру (0,5 л) та дорощують ще два місяці за тих самих умов, що і на попередньому етапі, до досягнення висоти 18 см та більше, і кількості вузлів – 10 вузлів та більше.

Повний цикл отримання саджанців ожини за даною схемою можна провести за 6 місяців. З урахуванням додаткових циклів живцювання – за 10 місяців.

Нижче представлено розрахунки коефіцієнта розмноження за використання удосконаленої біотехнології мікроклонування рослин ожини у перерахунку на 1 донорний експлант. Розрахунки виконано для 5 циклів живцювання в культурі *in vitro* на основі експериментальних даних, що було отримано у наших дослідках та представлено у підрозділах 3.1-3.6 та 5.1-5.3.

Таким чином, за удосконаленою біотехнологією мікроклонального розмноження ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі коефіцієнт розмноження дорівнює:

- 1) на стадії введення в культуру *in vitro*: 4,4 живця на 1 ініціальний експлант;
- 2) на стадії стерильного живцювання: 4,4 живця з попереднього етапу \times 1,9 пагонів на живці \times 3 вузли на кожному пагоні \times 5 циклів = 125 мікроклонів;
- 3) на стадії укорінення в культурі *in vitro*: 125 рослин \times 0,97 (відсоток укорінених) = 121 рослина;
- 4) на стадії адаптації до умов *ex vitro*: 121 мікроклон \times 0,84 (відсоток успішно адаптованих) = 102 адаптовані саджанці на 1 ініціальний експлант.

Отже, завдяки використанню запропонованої біотехнологічної схеми мікроклонування ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з 5 циклами стерильного живцювання можна за 10 місяців з одного ініціального експланта отримувати 102 одиниці генетично однорідного адаптованого садивного матеріалу.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Удосконалення біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження цінних рослин є важливим та актуальним напрямом досліджень. Особлива увага наразі приділяється етапам, що спричиняють найбільші втрати садивного матеріалу під час розмноження – введенню рослинних експлантів в культуру *in vitro* та адаптації мікроклонів до умов *ex vitro* із метою ефективного подолання адаптаційного стресу.

Для удосконалення біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження рослин павловнії та ожини на першому етапі було відпрацьовано методи введення рослинних експлантів в культуру *in vitro*, а також ефективного живцювання і укорінення. Вперше для дослідних культур рослин було впроваджено нові прийоми поверхневої стерилізації ініціальних експлантів з використанням фунгіцидних препаратів, що дозволило значно знизити ступінь контамінації та покращити приживлюваність. Було доведено позитивний вплив аскорбінової кислоти у середовищі МС на ріст і розвиток експлантів та встановлено оптимальні її концентрації для введення дослідних рослин в культуру *in vitro*. Наші результати доповнили та розширили вже відому інформацію про застосування аскорбінової кислоти з метою полегшення оксидативного стресу та фунгіцидів із метою запобігання контамінації (Ghatas et al. 2016; Bharti et al. 2018). Вперше досліджено вплив концентрації агару у живильному середовищі на ріст експлантів павловнії та ожини і встановлено, що використання напіврідкого середовища із 0,4% агару забезпечило покращення приживлюваності та інших агробіологічних характеристик мікроклонів.

Під час стерильного живцювання мікроклонованого матеріалу було підібрано найбільш оптимальні концентрації та співвідношення фітогормонів для розмноження дослідних рослин. Отримані результати можуть слугувати основою для підбору оптимального складу фітогормонів у живильному середовищі для культивування споріднених сортів та видів цінних господарських та декоративних рослин.

Вперше для культивування павловнії та ожини було проаналізовано можливості використання різноманітних желюючих агентів на різних етапах мікроклонування та визначено, що ГК (3%) рекомендована тільки для укорінення мікроклонів павловнії, а КК (7%) може використовуватися як альтернативний економічно вигідний желюючий агент середовища МС для мікроклонального розмноження рослин дослідних видів, за виключенням етапу укорінення ожини. Оскільки вартість КК на 2023 рік є більш, ніж у 30 разів меншою за агар, то економічна ефективність процесу мікроклонування за його використання значно підвищується, що підтверджується дослідженнями із підрахунками витрат на виробництво садивного матеріалу інших культур рослин (Fira et al. 2013).

На наступному етапі в результаті проведеної роботи реалізовано ідеєю удосконалення біотехнології клонування рослин шляхом штучної інокуляції клонованих рослин потенційно корисними мікроорганізмами з антагоністичними та рістстимулювальними властивостями на етапі адаптації мікроклонів. Це потенційно вплинуло на формування постійної мікробіоти ризосфери рослин, підвищило їх стійкість до враження фітопатогенами, приживлюваність мікроклонів та зовнішні характеристики рослин ожини і павловнії.

Для відбору корисних мікроорганізмів для штучної інокуляції клонованих рослин нами було вперше визначено наявність антагоністичної активності бактерій щодо 8 тест-штамів фітопатогенних грибів. Бактерії було отримано з колекції мікроорганізмів «Практично корисних та морських мікроорганізмів» кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова, яка є філією національної колекції мікроорганізмів (УКМ) та має статус національного надбання: *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 та 23 ізолятів актинобактерій.

Встановлення здатності до антагонізму було основою для визначення захисного потенціалу обраних бактерій відносно грибкових інфекцій, до яких мікроклоновані рослини під час адаптації є особливо сприйнятливими. Наявність

даних щодо активності кожного аналізованого штаму або ізоляту бактерій щодо конкретних фітопатогенів відкрило потенціал їх прицільного застосування для боротьби із відомими збудниками хвороб під час адаптації мікроклонів, або, потенційно, під час подальшого вирощування саджанців у відкритому ґрунті.

Результати наших дослідів демонстрували схожість із дослідженнями з визначення антагоністичної активності таксономічно близьких видів бактерій (Aalam et al. 2021; Diaz et al. 2021; Samaras et al. 2021) і значно доповнили вже наявні дані та відкрили нові можливості для аналізу антагоністичного потенціалу родів дослідних мікроорганізмів.

Окрім того, бактерії *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 та деякі з 23 ізолятів морських актинобактерій показали позитивний вплив на проростання насіння та ріст рослин крес-салату *in vitro*, що проявилось у підвищенні частки пророслого насіння, більшій довжині коренів та пагонів, а також кількості коренів у проростків у порівнянні з контрольним неінокульованим варіантом.

За показниками антагоністичної та рістстимулювальної активності із досліджених було відібрано 10 штамів мікроорганізмів (*E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. pactum* Conc4, *S. albidoflavus* Conc11) для адаптаційних експериментів з мікроклонованими рослинами ожини та павловнії.

В результаті проведених досліджень встановлено потенційну можливість використання цих бактерій як агентів, що сприяють адаптації, та стимуляторів росту мікроклонованих рослин. Виявлено, що за інокуляції коренів зростали середні показники приживлюваності, висоти пагонів, кількості вузлів, площі листа у адаптованих саджанців протягом 30 діб спостережень порівняно з неінокульованим контролем.

Можливі механізми впливу бактерій на рослини при цьому можуть бути дуже різноманітними. Наприклад, для *E. italicus* ONU547 описана здатність продукувати бактеріоцин, який значно підвищує свою активність після

нагрівання та має антагоністичну активність щодо фітопатогенних бактерій (Merlich et al. 2019). У попередніх дослідженнях було встановлено, що ентерокок є продуцентом органічних кислот, серед яких переважає оцтова (Merlich et al. 2017a), що може бути одним з факторів, який забезпечує антагонізм до фітопатогенів. Відомо, що бактерії штаму *E. italicus* ONU547, особливо, у консорціумах з іншими лактобактеріями, здатні утворювати біоплівки на поверхні коренів крес-салату. Такі адгезивні властивості є важливою рисою для забезпечення ефективного захисту рослин та кращого проникнення метаболітів бактерій у міжклітинний простір (Merlich et al. 2017b).

Рістстимулювальні властивості ентерокока можна попередньо пояснити вірогідним синтезом фітогормонів, оскільки для ентерококів вже відомі такі можливості (Lee et al. 2015), а, також, можливо, солубілізацією фосфатів, як це вже було показано для ентерококів у іншому дослідженні (Mello et al. 2020). Перевірка цієї гіпотези для штаму *E. italicus* ONU547 буде предметом наших подальших досліджень.

Для дослідних штамів бацил також попередньо були відомі певні рістстимулювальні та захисні властивості для рослин. Наприклад, для *B. megaterium* ONU500 було визначено здатність до утворення біоплівок на коренях рослин (Мрачковська та ін. 2015), стимулювання росту соняшника та томатів (Babenko et al. 2016b; Швець та ін. 2021), продукції сидерофорів (Защинська 2019). Для інших штамів бацил *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 та *B. subtilis* ONU559 було проведено аналіз геномів та виявлено кластери, що можуть кодувати синтез антибіотиків, протигрибкових речовин та сидерофорів (Іваниця та ін. 2021). Для бактерій цих штамів проведено також метаболомний аналіз, що підтвердив наявність синтезу фенгіцинів та сурфактинів, і продукцію деяких метаболітів із невідомими на сьогодні функціями (Ostapchuk et al. 2020). Також, за непрямыми ознаками впливу, високо вірогідним для дослідних бактерій є синтез речовин фітогормональної природи. На це вказує варіативність приросту висоти, кількості вузлів, площі листа та додаткових пагонів за інокуляції різними

дослідними штамми. Проте, перевірка цього припущення потребує подальших досліджень.

Під час роботи з актинобактеріями ми спиралися на дані подібних експериментів інших дослідників, а також результати власних дослідів – антагоністичної активності, впливу на ріст рослин крес-салату, а потім і мікроклонів ожини та павловнії під час адаптації до умов *ex vitro*. Також, згідно із попереднім аналізом неопублікованих досліджень метаболізму деяких дослідних актинобактерій Штеніковим М.Д. (особисте спілкування, 17 серпня 2023), нам було відомо їх потенційні можливості до синтезу речовин захисної та регуляторної дії: наприклад, актинобактерії *S. ambofaciens* Myt7ch продемонстрували потенційну здатність до синтезу таких біологічно активних метаболітів, як саттазолін А, різні типи герміцидинів, фузанін С, ентероцин та інші. Бактерії *S. pactum* Conc4, у свою чергу, попередньо показали наявність синтезу таких речовин, як альбонурсін, бхімаміцин Б, проміжні сполуки біосинтезу міцинаміцину, та інших речовин.

Отже, інокуляція актинобактеріями *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. pactum* Conc4 була ефективною для успішної постасептичної адаптації мікроклонів павловнії та ожини. Наші результати розширили досвід використання актинобактерій, виділених із «екстремальних» екологічних ніш, для стимуляції росту та захисту рослин. З відомих на сьогодні подібних наукових робіт у цьому напрямі можна виділити дослідження Retnowati et al. (2019), де було встановлено, що асоційованим із морськими губками актинобактеріям властивий широкий спектр корисних для рослин властивостей: здатність до солюбілізації фосфатів, синтезу фітогормонів, фіксації азоту, пригнічення росту деяких фітопатогенів. А у експериментах Rangseekeaw et al. (2021), глибоководні морські бактерії позитивно впливали на ріст саджанців томатів та пом'якшували стрес у рослин за вирощування в умовах підвищеної солоності ґрунту. При цьому, характер впливу актинобактерій має зазвичай дуже різноманітне походження: синтез антибіотиків та летких речовин, гідролітичних ферментів, фітогормонів, АЦК-деамінази, сидерофорів; сприяння симбіозу

рослин з іншими корисними мікроорганізмами, солнобілізація фосфатів у ґрунті, гіперпаразитизм та деякі інші (Palaniyandi et al. 2013). Які саме механізми впливу було задіяно у випадку взаємодії мікроклонів із дослідними актинобактеріями під час адаптації ожини та павловнії, буде з'ясовано після проведення детального аналізу геномів та метаболомів відібраних мікроорганізмів, та додаткових експериментів зі встановлення конкретних рістстимулювальних властивостей.

Отже, отримані результати свідчать про значний потенціал бактерій *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. pactum* Conc4, *S. albidoflavus* Conc11 як стимуляторів росту та розвитку рослин та відкриває можливості їх використання на етапі адаптації до умов *ex vitro* після мікроклонального розмноження. Дані мікроорганізми можуть бути рекомендовані для подальших досліджень та є перспективними для інокуляції мікроклонованих рослин ожини та павловнії на етапі адаптації до умов *ex vitro*.

За результатами проведеної роботи було отримано патент на винахід 126710 МПК А01N63/22 «*Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпopeптидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю» (Іваниця та ін. 2023); та подано заявку на патент на винахід №a202204268 «Штам *Streptomyces ambofaciens* ONU561 з антибіотичною та рістстимулювальною активностями».

Завдяки аналізу ефективності дії на кожен дослідний показник у адаптованих мікроклонів ожини та павловнії визначено найбільш дієві мікроорганізми для кожної дослідної культури рослин. Загалом, встановлено, що найбільш ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів Павловнії повстяної були бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch. Для адаптації Ожини звичайної – *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547 у концентрації 10^7 КУО/мл, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch. Ці мікроорганізми у подальших

наших дослідженнях будуть слугувати основою створення консорціуму бактерій для ефективної адаптації рослин до умов *ex vitro*.

Відповідно до результатів порівняльного аналізу ефективності впливу дослідних мікроорганізмів, для моноінокуляції мікроклонів павловнії рекомендуємо бактерії штаму *B. megaterium* ONU500, а для моноінокуляції мікроклонів ожини – *B. velezensis* ONU553.

За результатами проведених досліджень створено удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу павловнії та ожини шляхом мікроклонального розмноження з використанням мікроорганізмів на етапі адаптації мікроклонів до умов *ex vitro*.

Таким чином, усі запропоновані підходи удосконалення різних етапів мікроклонального розмноження ожини та павловнії, особливо використання рістстимулювальних мікроорганізмів, можуть бути застосовані як у наукових установах, так і в комерційному секторі для розробки ефективних біотехнологій процесу клонування рослин інших видів з мінімальними втратами рослинного матеріалу та отриманням великої кількості генетично однорідних саджанців.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та апробовано удосконалену біотехнологію мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів на стадії постасептичної адаптації.

1. Встановлено, що поверхнева стерилізація ініціальних експлантів павловнії за використання препарату Хорус (ципродинілу) у концентрації 1,4 г/л знижує рівень контамінації на 48,3% та підвищує приживлюваність на 45,0%, а для експлантів ожини використання препарату Скор (дифенокназолу) у концентрації 1 мл/л знижує рівень контамінації на 38,4% та підвищує приживлюваність на 51,6%.

2. Показано позитивний вплив аскорбінової кислоти на ріст та розвиток експлантів за оптимальної концентрації у складі середовища на етапі введення в культуру *in vitro*: 50 мг/л – для павловнії та 100 мг/л – для ожини.

3. Визначено, що напіврідке агаризоване середовище із 0,4% агару на етапі введення в культуру *in vitro* у експлантів павловнії забезпечує підвищення приживлюваності на 8,3%, прискорення проліферації бруньок на 1,1 доби та збільшення кількості утворених пагонів на 0,6 пагонів на експлант, а для ожини – прискорення проліферації бруньок на 0,4 доби порівняно із експлантами на твердому середовищі МС із 0,8% агару.

4. Встановлено, що для стерильного живцювання для павловнії оптимальним є фітогормональний склад середовища, що містить 2,0 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК, а для ожини – 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК.

5. Кукурудзяний крохмаль у концентрації 7% рекомендовано використовувати як желуючий агент у середовищі для введення в культуру *in vitro*, стерильного живцювання і укорінення рослин павловнії, та на всіх етапах мікроклонування ожини, окрім укорінення. Гуарова камедь у концентрації 3% показана тільки для укорінення мікроклонів павловнії, оскільки за її використання на інших етапах може спостерігатися затримка росту та розвитку мікроклонів.

6. Встановлено антагоністичну активність бактерій *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559 та 23 ізолятів актинобактерій щодо тест-штамів фітопатогенних грибів *A. niger*, *F. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *R. cerealis*, *P. variotii* та *P. expansum*.
7. Виявлено, що антагоністично активні бактерії *E. italicus* ONU547, *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. pactum* Conc4, *S. albidoflavus* Conc11 стимулюють проростання насіння та ріст рослин крес-салату *in vitro*, із підвищенням частки пророслого насіння, збільшенням довжини коренів та пагонів, а також кількості коренів у проростків у порівнянні з контролем. Дані мікроорганізми було обрано для інокуляції мікроклонів.
8. Встановлено, що серед обраних антагоністично активних бактерій з рістстимулювальною активністю для успішної постасептичної адаптації мікроклонів павловнії ефективними були *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch і *S. albidoflavus* Conc32, а для адаптації ожини – *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32 та *S. ambofaciens* Myt7ch.
9. За аналізом ефективності впливу дослідних мікроорганізмів на процеси адаптації визначено, що для моноінокуляції мікроклонів павловнії найбільш ефективним є використання бактерій штаму *B. megaterium* ONU500, а для моноінокуляції мікроклонів ожини – бактерій штаму *B. velezensis* ONU553.
10. За результатами проведених досліджень створено удосконалені біотехнологічні схеми отримання садивного матеріалу павловнії та ожини шляхом мікроклонального розмноження з використанням мікроорганізмів на етапі адаптації мікроклонів до умов *ex vitro*, і надано практичні рекомендації.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Білай, В.І. (1982). Методи експериментальної мікології. К.: Наукова думка.
2. Висоцький, В. А. Клональне мікророзмноження рослин (1986). Культура клітин рослин та біотехнологія. М.: Наука.
3. Зацинська, О.С. (2019). Мікробні сидерофори як можливі фактори антагонізму бактерій *Bacillus megaterium* щодо патогенних *Agrobacterium* spp. Збірка матеріалів наукового товариства студентів, аспірантів і молодих вчених. Одеса: Репозитарій наукової бібліотеки ОНУ імені І.І. Мечникова. Отримано з <http://dspace.onu.edu.ua:8080/handle/123456789/24687>.
4. Іваниця, В. О., Штеніков, М. Д., Остапчук, А. М., Горшкова, О. Г., Теслюк, Н. І., Титаренко, Н. В., & Гудзенко, Т. В. (2023). Пат. 126710 України МПК А01N63/22. Штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю. Київ: Національний орган інтелектуальної власності - державна організація “Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій”. Отримано з <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1718149/>.
5. Іваниця, В.О., Гудзенко, Т.В., Страшнова, І.В., Васильєва, Н.Ю., Штеніков, М.Д., Коротаєва, Н.В., ... & Чабан, М.М. (2021). Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія. Одеса: Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова.
6. Кунах, В. А. (2005). Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос.
7. Ліннік, А. (2020). Павловнія як енергетична культура. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького. Серія: Сільськогосподарські науки, 22(92), 19-22.
8. Мрачковська, Ю. О., Крилова, К. Д., & Галкін, Б. М. (2015). Формування біоплівки пробіотичним штамом *Bacillus megaterium* ONU500 на коренях рослин *Lepidium sativum* L. В Біологія: від молекули до біосфери. Матеріали

- Х Міжнародної конференції молодих учених (2–4 грудня 2015 р., м. Харків, Україна) (с. 256). Х.: ФОП Шаповалова Т. М.
9. Оразбаєва, Г. К., Майсупова, И. Л., Хасанов, В. Т., & Швидченко, В. К. (2012). Клональне розмноження рослин червоної малини (*Rubus idaeus* L.) *in vitro*. Вісник науки КазАТУ ім. С. Сейфулліна, 1(72), 140-149.
 10. Подгаєцький, А. А., Мацкевич, В. В., & Подгаєцький, А. А. (2018). Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАЦ.
 11. Титаренко, Н. В. (2017). Оптимізація клонального мікророзмноження ожини в культурі *in vitro*. У Інноваційні технології та інтенсифікація національного виробництва: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, частина 1, Тернопіль, 187-189. Тернопіль: Крок.
 12. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018a). Використання штамів *Bacillus megaterium* та *Enterococcus italicus* для мікроклонального розмноження рослин. У Теорія і практика актуальних наукових досліджень: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Одеса, 28-29 квітня 2018, 39-41. Херсон: Видавництво «Молодий вчений».
 13. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018b). Адаптація мікроклонів ожини (*Rubus caesius*) до умов *in vivo* з використанням культур мікроорганізмів. У Актуальні питання сучасної науки: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, част. II, м. Київ, 29-30 квітня 2018, 63-65. Київ: МЦНД.
 14. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020a). Використання аскорбінової кислоти для процесу введення рослин в культуру *in vitro*. У Гуманітарні та природничі науки: актуальні питання: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 23-24 жовтня 2020, 40-44. Херсон: Видавництво «Молодий вчений».
 15. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020b). Удосконалення процесів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі. Мікробіологія і біотехнологія, 2, 72-84.

16. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2021). Використання препаратів фунгіцидної дії для запобігання контамінації під час введення рослин в культуру *in vitro*. Міжнародний науковий журнал «Грааль науки», 7, 131-133.
17. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2020). Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин. Мікробіологія і біотехнологія, 3, 6-31.
18. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2023). Вплив актинобактерій на адаптацію до умов *ex vitro* та ріст мікроклонованих рослин *Rubus fruticosus* L. Мікробіологія і біотехнологія, 1(57), 18-41.
19. Черевченко, Т. М., Лаврентьєва, А. Н., & Іванніков, Р. В. (2008). Біотехнологія тропічних і субтропічних рослин *in vitro*. Київ: Наукова думка.
20. Швець, Ю. А., Крилова, К. Д., & Лиманська, Н. В. (2021). Вплив *Bacillus megaterium* ONU500 на проростання та ріст сіянців соняшника. Мікробіологія і біотехнологія, 1(51), 45-54.
21. Штеніков, М. Д., Остапчук, А.М., & Іваниця, В.О. (2020). Склад жирних кислот, амінокислот та моносахаридів бактерій роду *Bacillus*, виділених з донних відкладень чорного моря. Мікробіологія і біотехнологія, 1(48), 20-31.
22. Aallam, Y., Maliki, B. E., Dhiba, D., Lemriss, S., Souiri, A., Haddioui, A., ... & Hamdali, H. (2021). Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp. Microorganisms, 9, 1429.
23. Aallam, Y., Maliki, B. E., Dhiba, D., Lemriss, S., Souiri, A., Haddioui, A., Tarkka, M., & Hamdali, H. (2021). Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp. Microorganisms, 9, 1429.

24. Abd-El-Kareem, F., Elshahawy, I., & Abd-Elgawad, M. (2021). Application of *Bacillus pumilus* isolates for management of black rot disease in strawberry. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 25.
25. Abdalla, M.M., & Mostafa, R.A. (2016). *In vitro* Propagation of Blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Assiut J. Agric. Sci.*, 46(3), 88-99.
26. Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8, 677.
27. Abdollahi, M. R., Najafi, S., Sarikhani, H., & Moosavi, S. S. (2016). Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 6.
28. Abdrabboh, G. A., Khalifa, S. M., Abdel Aziz, H. F., & El-Rashdy, A. S. (2021). *In vitro* propagation of blackberries (*Rubus* sp) Prime-Ark 45 cultivar. In 5th International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture (ICBAA), Benha University, 8 April 2021, Egypt (Conference Online) Plant Biotechnology (pp. 287-294).
29. Abou El-ghait, E.M., Youssef, A.S.M., Sadawy, F.M., & Mohammed, A.A.A. (2022). Mass production of *Paulownia tomentosa* trees by micropropagation. *Journal of Plant Production*, Mansoura University, 13(5), 159-165.
30. Acquaah, G. (2012). Clonal propagation and *in vitro* culture. In G. Acquaah (Ed.), *Principles of Plant Genetics and Breeding*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd.
31. Agake, S.-i., Ohwaki, Y., Kojima, K., Yoshikawa, E., Artigas Ramirez, M. D., Bellingrath-Kimura, S. D., Yamada, T., Ookawa, T., Ohkama-Ohtsu, N., & Yokoyama, T. (2022). Biofertilizer with *Bacillus pumilus* TUAT1 spores improves growth, productivity, and lodging resistance in forage rice. *Agronomy*, 12(10), 2325.
32. Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R., & Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and

secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. AMB Express, 12, 3.

33. Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., & Ademoyegun, O.T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology, 8, 3782-3788.
34. Al Ghasheem, N., Stanica, F., Peticila, A. G., & Yenat, O. (2018). *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants. Scientific Papers, 67, 227-234.
35. Al-Ani, L.K.T. (2019). Secondary metabolites of nonpathogenic *Fusarium* spp.; scope in agriculture. In H.B. Singh, C. Keswani, M.S. Reddy, E.S. Royano, & C. García-Estrada (Eds.), Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications (pp. 125-143). Singapore: Springer.
36. Alblooshi, A. A., Purayil, G. P., Saeed, E. E., Ramadan, G. A., Tariq, S., Altaee, A. S., ... & AbuQamar, S. F. (2023). Biocontrol Potential of Endophytic Actinobacteria against *Fusarium solani*, the Causal Agent of Sudden Decline Syndrome on Date Palm in the UAE. Journal of Fungi, 8(8), 8.
37. Alkhateeb, A., & Alturki, S. (2014). A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Advances in Environmental Biology, 8(6), 263-269.
38. Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., & Freitas, A. R. (2021). *Enterococcus* spp. as a producer and target of bacteriocins: A double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. Antibiotics, 10(10), 1215-1232.
39. Amlesom, W. S., Mehari, T., & Saleh, B. K. (2021). Evaluation of different starches as gelling agents for micropropagation of potato. Journal of Agricultural Science, 13(5), 144.
40. Anderson, W. D. (1980). Mass propagation by tissue culture: Principles and practice. In Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture — Application and feasibility (pp. 1-10). Beltsville,

Maryland, U.S.A., U.S.D.A. Science and Education Administration, ARR-NE-11.

41. Araujo, R. C., Rodrigues, F. A., Nadal, M. C., Ribeiro, M. S., Antonio, C. A. C., Rodrigues, V. A., ... & Doria, J. (2021). Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp. and *Buttiauxella agrestis* strains. *Microbiological Research*, 248, 126750.
42. Ardanov, P., Leonid, O., Iryna, Z., Natalia, K., & Maria, P. A. (2011). Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, 56, 43-49.
43. Arkhipova, T. N., Prinsen, E., Veselov, S. U., Martinenko, E. V., Melentiev, A. I., & Kudoyarova, G. R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292(1-2), 305-315.
44. Asayesh, Z. M., Vahdati, K., Aliniaiefard, S., & Askarib, N. (2017). Enhancement of *ex vitro* acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 220, 114-121.
45. Babbar, S. B., Jain, R., & Walia, N. (2005). Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(3), 258-261.
46. Babenko, D. O., Krylova, K. D., Uzhevskaya, S. P., & Ivanytsia, V. O. (2016a). Determination of strain *Bacillus megaterium* ONU500 larvicidal activity against mushrooms pest *Bradysia pilistriata* frey (Sciaridae). In "Molecular microbiology and biotechnology," International scientific conference: Abstracts, Odessa, Ukraine, June 21-23, 2016 (pp. 1-2). Odessa I.I. Mechnikov National University.
47. Babenko, D. O., Mrachkovska, Yu. O., & Krylova, K. D. (2016b). Дія бактерій штаму *Bacillus megaterium* ONU500 на вегетуючі рослини *Lycopersicon esculentum*. In XIIth International Scientific and Practical Conference "Biotechnology for agriculture and environmental protection": Proceedings (pp. 244). Odesa: I.I. Mechnikov Odesa National University.
48. Badri, D. V., Chaparro, J. M., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2013). Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates

- of arabadopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 4502-4512.
49. Baghdady, G. (2021). *In vitro* Propagation of Blackberries (*Rubus* sp) Prime-Ark 45 Cultivar. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59(5), 287-294.
 50. Balla, I., Vertesy, J., Koves-Pechy, K., Voros, I., Bujtas, Z., & Biro, B. (1998). Acclimation results of micropropagated black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by symbiotic micro-organisms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 113-115.
 51. Barat, L., & Perrotte, J. (2021). Optimisation of the micropropagation protocol of cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Acta Horticulturae*, 1309, 493-500.
 52. Barton, I.L., Nicholas, I.D., & Ecroyd, C.E. (2007). Paulownia. *The Forest Research Bulletin*, 231, 5-68.
 53. Ben Braïek, O., Cremonesi, P., Morandi, S., Smaoui, S., Hani, K., & Ghrairi, T. (2018). Safety characterization and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing *Enterococcus lactis* 4CP3 strain. *Microbial Pathogenesis*, 118, 32-38.
 54. Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1.
 55. Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 148.
 56. Bergmann, B.A., & Moon, H.K. (1997). *In vitro* adventitious shoot production in paulownia. *Plant Cell Reports*, 16, 315-319.
 57. Bharti, N., Kapoor, B., Shaunak, I., Sharma, P., & Sharma, R. (2018). Effect of sterilization treatments on *in vitro* culture establishment of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 1165-1168.
 58. Bhat, M.S., Rather, Z.A., Nazki, I.T., Banday, N., Wani, T., Rafiq, S., Farooq, I., Noureldeen, A., & Darwish, H. (2022). Standardization of *in vitro*

micropropagation of Winter Jasmine (*Jasminum nudiflorum*) using nodal explants. Saudi Journal of Biological Sciences, 29, 3425-3431.

59. Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 34(1), 15-25.
60. Borah, A., Hazarika, S. N., & Thakur, D. (2022). Potentiality of actinobacteria to combat against biotic and abiotic stresses in tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze). Journal of Applied Microbiology, 133(4), 2314-2330.
61. Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. In D. K. Maheshwari (Ed.), Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses (pp. 41-76).
62. Borriss, R. (2013). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. In F. J. de Bruijn (Ed.), Molecular microbial ecology of the rhizosphere (Vol. 2, pp. 883-898).
63. Bosnjak, D., Markovic, M., Agic, D., Vinkovic, T., Tkalec, M., Ravnjak, B., & Stanisavljevic, A. (2021). The influence of nutrient media modification on the morphological parameters in Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Micropropagation in the Liquid and Semi-solid Media. Poljoprivreda, 27(1), 22-29.
64. Bottini, R., Cassan, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 497-503.
65. Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 27, 30-37.
66. Budiharjo, A., Chowdhury, S. P., & Dietel, K. (2014). Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. plantarum FZB42 revealed that the *nfrA* and the RBAM17410 genes are involved in plant-microbe interactions. PLoS One, 9, e91587.

67. Burlak, O. P., de Vera, J. P., Yatsenko, V., & Kozyrovska, N. O. (2013). Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress. *Biopolymers and Cell*, 29(1), 3-10.
68. Caldwell, J.D. (1984). Blackberry propagation. *HortScience*, 2, 193-195.
69. Carvalho, T. L. G., Ballesteros, H. G. F., Thiebaut, F., Ferreira, P. C. G., & Hemerly, A. S. (2016). Nice to meet you: Genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in nonleguminous plants. *Plant Molecular Biology*, 90, 561-574.
70. Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernandez, V., De la Cruz-Enriquez, J., Castaneda-Antonio, M. D., & Munoz-Rojas, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 140-154.
71. Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 171-198.
72. Chaurasia, L. K., Tirwa, R. K., & Tamang, B. (2022). Potential of *Enterococcus faecium* LM5.2 for lipopeptide biosurfactant production and its effect on the growth of maize (*Zea mays* L.). *Archives of Microbiology*, 204(4), 223-238.
73. Chen, X. H., Koumoutsis, A., & Scholz, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140, 27-37.
74. Chinnappan, R. S. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11, 165-172.
75. Chowdhury, S. P., Dietel, K., & Randler, M. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One*, 8, e68818.
76. Chunchukov, A., & Yancheva, S. (2015). Micropropagation of *Paulownia* species and hybrids. In *First National Conference of Biotechnology* (Vol. 100, Issue 4, pp. 223-230).

77. Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The Plant Pathology Journal*, 31(2), 152-164.
78. Clapa, D., Harta, M., & Pop, C. (2021). Micropropagation of Raspberries (*Rubus idaeus* L.) in Liquid Media by Temporary Immersion Bioreactor in Comparison with Gelled Media. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 78, 56-62.
79. Cobrado, J.S., & Fernandez, A.M. (2016). Common fungi contamination affecting tissue-cultured Abaca (*Musa textiles* Nee) during the initial stage of micropropagation. *Asian Research Journal of Agriculture*, 1(2), 1-7.
80. Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, 58, 435-455.
81. Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E., & Clement, C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: From the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 84-93.
82. Cosmulescu, S., Scricciu, F., & Manda, M. (2020). Determination of leaf characteristics in different medlar genotypes using the ImageJ program. *Horticultural Science*, 47, 117-121.
83. Crisan, L.R., & Petrus-Vancea, A. (2016). *Paulownia tomentosa* L. *in vitro* propagation. *Natural Resources and Sustainable Development*, 6, 30-37.
84. Dahlberg, K. R., & Van Etten, J. L. (1982). Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 281-301.
85. David, O. M., & Onifade, O. E. (2018). Effect of partially purified enterocins from *Enterococcus faecalis* strains on the growth of some phytopathogenic fungi. *Ruhuna Journal of Science*, 9(2), 160-168.
86. Deb, C. R., & Imchen, T. (2010). An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. *Biotechnology*, 9, 79-83.

87. Debois, D., Jourdan, E., & Smargiasso, N. (2014). Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Analytical Chemistry*, 86, 4431-4438.
88. Diaz, D., Pizzolitto, R., Vazquez, C., Usseglio, V., Zunino, M., Dambolena, J., Zygadlo, J., & Merlo, C. (2021). Effects of the volatile organic compounds produced by *Enterococcus* spp. strains isolated from maize grain silos on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Journal of Stored Products Research*, 93(1), 101-120.
89. Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32, 1682-1694.
90. Donnelly, D. J., & Vidarver, W. E. (1984). Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 172-176.
91. Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 227-243.
92. Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Riseh, R., & Tarkka, M. T. (2022). Actinobacteria as Effective Biocontrol Agents against Plant Pathogens, an Overview on Their Role in Eliciting Plant Defense. *Microorganisms*, 10, 1739.
93. El-Baky, N. A., Abdel Rahman, R. A., Sharaf, M. M., & Amara, A. A. A. F. (2021). The development of a phytopathogenic fungi control trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* infection in jojoba tissue culture as a model. *Scientific World Journal*, 2021, 6639850.
94. Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., & Mustapha, B. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1503-1509.
95. Fan, B., Chen, X. H., & Budiharjo, A. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42,

- engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151, 303-311.
96. Fathy, H., El-Leel, O., Amin, M., & AbuEl-Leel, O. (2020). Micropropagation and Biomass Production of *Rubus fruticosus* L. (Blackberry) plant. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 08(04), 1215-1228.
 97. Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from the rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *Biomed Research International*, 2013, 40-57.
 98. Fira, A., Magyar-Tábori, K., Hudák, I., Clapa, D., & Dobránszky, J. (2013). Effect of gelling agents on *in vitro* development of *Amelanchier canadensis* 'Rainbow Pillar.' *International Journal of Horticultural Science*, 19(3-4), 191-196.
 99. Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42, 23-46.
 100. Gamborg, O.L., Miller, R.A., & Ojima, K. (1968). Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 150-158.
 101. Gangopadhyay, M., Nandi, S., & Roy, S. K. B. (2017). An efficient ex plant sterilization protocol for reducing microbial contamination of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri jyoti' for establishing micropropagation in rainy season. *J. Basic Appl. Plant Sci.*, 1, 25.
 102. Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Cheng, X., & Yang, Q. (2020). Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 56, 143-149.
 103. Ghatas, Y. A. A. (2016). Employment of tissue culture techniques in improvement propagation of *Paulownia tomentosa* plant. *Journal of Plant Production, Mansoura University*, 7(6), 619-625.

104. Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: Connecting plant growth and defense. *Functional Ecology*, 27, 599-609.
105. Gonçalves, S., Martins, N., & Romano, A. (2017). Physiological traits and oxidative stress markers during acclimatization of micropropagated plants from two endangered *Plantago* species: *P. algarbiensis* Samp. and *P. almogravensis* Franco. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 53, 249-255.
106. Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agricultural crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1231-1240.
107. Gupta, S., & Chaturvedi, P. (2022). Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops.
108. H-Kittikun, A., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffres, E., Xavier, D., Pillot, G., Haertle, T., Chobert, J. M., & Hwanhlem, N. (2015). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization, and safety evaluation. *Food Control*, 54, 126-134.
109. Hamaoka, K., Aoki, Y., & Suzuki, S. (2021). Isolation and characterization of endophyte *Bacillus velezensis* KOF112 from grapevine shoot xylem as biological control agent for fungal diseases. *Plants*, 10(9), 1815.
110. Han, X., Shen, D., Xiong, Q., Bao, B., Zhang, W., Dai, T., Zhao, Y., Borriss, R., & Fan, B. (2021). The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *Phytophthora sojae* due to bacilysin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23), e0160121.
111. Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 154.

112. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16, 463-471.
113. Hazarika, B. N., Parthasarathy, V. A., & Nagaraju, V. (2000). Paclobutrazol induced biochemical changes in microshoots of citrus species. *Folia Horticulturae*, 12, 69-77.
114. Hazarika, N. B., Teixeira Da Silva, J., & Taiukdar, A. (2006). Effective acclimatization of *in vitro* cultured plants: methods, physiology and genetics. In J. A. Teixeira da Silva (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (Vol. II)* (pp. 427-438). Global Science Books.
115. Herman, E.B. (2017). Plant tissue culture contamination: challenges and opportunities. *Acta Horticulture*, 1155, 231-238.
116. Herzner, A. M., Dischinger, J., & Szekat, C. (2011). Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One*, 6, e22389.
117. Houicher, A., Alkay, Z., Bourahla, M., & Dertli, E. (2021). Virulence factors, antibiotic resistance, and antimicrobial activity of *Enterococcus* spp. isolated from different sources in Algeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(2), e1907.
118. Hussain, T., Khan, A. A., & Khan, M. (2021). Biocontrol of soil-borne pathogen of potato tuber caused by *Rhizoctonia solani* through biosurfactant-based *Bacillus* strain. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 7(1), 54-66.
119. Idris, E. E. S., Iglesias, D. J., & Talon, M. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects the level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 619-626.
120. Idris, E. E. S., Makarewicz, O., & Farouk, A. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 45 contributes to its plant growth-promoting effect. *Microbiology*, 148, 2097-2109.
121. Irshad, M., Rizwan, H. M., Debnath, B., Anwar, M., Li, M., Liu, S., He, B., & Qiu, D. (2018). Ascorbic Acid Controls Lethal Browning and Pluronic F-68

Promotes High-frequency Multiple Shoot Regeneration from Cotyledonary Node Explant of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). HortScience, 53(2), 183-190.

122. Isah, T. (2019). Changes in the biochemical parameters of albino, hyperhydric and normal green leaves of *Caladium bicolor* cv. "Bleeding hearts" *in vitro* long-term cultures. J. Photochem. Photobiol. B Biol., 191, 88-98.
123. Ishtiaq, A., Tanveer, H., Irfan, A., Nafees, M., Rafay, M., & Iqbal, M. (2013). Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 13(4), 539-547.
124. Jennings, D.L., Daubeney, H.A., & Moore, J.N. (1991). Blackberries and raspberries (*Rubus*). Acta Horticulturae, 290, 331-392.
125. Jinhua, C., Yang, S. H., Palaniyandi, S. A., Han, J. S., Yoon, T. M., Kim, T. J., & Suh, J. W. (2010). Azalomycin F complex is an antifungal substance produced by *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 isolated from agricultural soil. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 53(5), 545-552.
126. Jugreet, B. S., & Mahomoodally, M. F. (2020). Essential oils from 9 exotic and endemic medicinal plants from Mauritius shows *in vitro* antibacterial and antibiotic potentiating activities. S. Afr. J. Bot., 132, 355-362.
127. Kaewkla, O., Suriyachadkun, C., & Franco, C. M. M. (2021). *Micromonospora veneta* sp. nov., an endophytic actinobacterium with potential for nitrogen fixation and for bioremediation. Archives of Microbiology, 203, 2853-2861.
128. Kalantari, N., Nazarian-Firouzabadi, F., & Darvishnia, M. (2019). The potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from Iranian Oak sap to control plant pathogens. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 8(2), 87-99.
129. Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Mafei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. Frontiers in Plant Science, 6, 151.
130. Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 649-655.

131. Kirina, I. B., Belosokhov, F. G., Titova, L. V., Suraykina, I. A., & Pulpitow, V. F. (2020). Biochemical assessment of berry crops as a source of production of functional food products. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 548(8), 082068.
132. Kozai, T. (1988). High technology in protected cultivation from environmental control engineering point of view. In Horticulture in high technology era (pp. 1-43). Tokyo: Special Lecture.
133. Krober, M., Wibberg, D., & Grosch, R. (2014). Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. Frontiers in Microbiology, 5, 252.
134. Kumar, A., Singh, S., Mukherjee, A., Rastogi, R. P., & Verma, J. P. (2021). Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. Microbiological Research, 242, 126616.
135. Kumar, K., Dhatt, A. S., & Gill, M. I. S. (2001). *In vitro* plant regeneration in kinnow mandarin (*Citrus nobilis*). Indian Journal of Horticulture, 58, 299-302.
136. Kumar, S., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. (2016). Biosurfactant-mediated biocontrol of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot in *Vigna mungo* by a plant growth-promoting *Enterococcus* sp. BS13. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 7(11), 122-143.
137. Kundu, S., Pedada Sindhusa, Anil Kumar. (2022). Micro-propagation techniques in horticultural crops and various factors affecting it: A review. Modern Phytomorphology, 16, 4-8. ISSN 2226-3063 e-ISSN 2227-9555
138. Lawal, B. (2014). Applied Statistical Methods in Agriculture, Health and Life Sciences. Germany: Springer International Publishing.
139. Lee, K. E., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., & Kim, J. H. (2015). *Enterococcus faecium* LKE12 cell-free extract accelerates host plant growth via gibberellin and indole-3-acetic acid secretion. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(9), 1467-1475.

140. Leite, M. S., Furtado-Pinto, T. E., Rabelo-Centofante, A., Rubio-Neto, A., Guimaraes-Silva, F., Goncalves-Selari, P. J. R., & Martins, P. F. (2021). Acclimatization of *Pouteria gardeneriana* Radlk micropropagated plantlets: Role of *in vitro* rooting and plant growth-promoting bacteria. *Curr. Plant Biol.*, 27, 121-138.
141. Lapse, L., & Laugale, V. (2009). Micropropagation, rooting and acclimatization of blackberry 'Agavam'. *Acta Horticulturae*, 43-49.
142. Li, X., Zhao, H., & Chen, X. (2021). Screening of marine bioactive antimicrobial compounds for plant pathogens. *Marine Drugs*, 19, 69.
143. Lin, L., & Xu, X. (2013). Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Current Microbiology*, 67, 209-217.
144. Liu, D., Yan, R., Fu, Y., Wang, X., Zhang, J., & Xiang, W. (2019). Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2077.
145. Liu, X., Bolla, K., Ashforth, E. J., Zhuo, Y., Gao, H., Huang, P., Stanley, S. A., Hung, D. T., & Zhang, L. (2012). Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 55-66.
146. Liu, Z., Budiharjo, A., & Wang, P. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 10081-10090.
147. Liu, Z., Jiao, R. L., Chen, S. Y., Ren, Y., Zhang, L., Zhang, D., ... & Guoying, L. (2022). First report of fruit rot of grapes (*Vitis vinifera*) caused by *Cladosporium cladosporioides* in Xinjiang, China. *Plant Disease*, 106(3), 315-328.
148. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Combined Proceeding of the International Plant Propagators' Society*, 30, 421-427.

149. Lopes, E., Silva, A., Mergulhão, A., Silva, E., Santiago, A., & Figueiredo, M. (2019). Co-Inoculation of growth promoting bacteria and *Glomus clarum* in micropropagated Cassava plants. *Revista Caatinga*, 32, 152-166.
150. Ludwig-Müller, J. (2015a). Plants and endophytes: Equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*, 37, 1325-1334.
151. Ludwig-Müller, J. (2015b). Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, 172, 4-12.
152. Lugtenberg, B. (Ed.). (2014). *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (1st ed.). Springer Cham.
153. Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., & Freitas, H. (2011). Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants - effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 230-237.
154. Maany, D., Atwa, N., Ahmed, I., El-Diwany, El-Wasief A., & Amer, M. N. (2019). Production of a polypeptide antimicrobial compound by lactic acid bacteria isolated from rhizospheric soil of Egyptian organic farms. *International Journal of Applied Pure Science and Agriculture*, 5(2).
155. Madzikane, O., Gebashe, F.C., Amoo, S.O. (2022). Use of alternative components in cost-effective media for mass production of clonal plants. In S. Gupta & P. Chaturvedi (Eds.), *Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops*. Singapore: Springer.
156. Magar, L. B., Shrestha, N., Khadka, S., Joshi, J. R., Acharya, J., Gyanwali, G. C., Marasini, B. P., Rajbahak, S., Parajuli, N. (2016). Challenges and opportunity of *in vitro* propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. for commercial production in Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 4(2), 155-160.
157. Mahallesli, M., & Sokak, M. (2016). Effects of using gelling agent guar gum and different sugar sources on potato micropropagation. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 3(4), 249-254.

158. Maignien, L., DeForce, E. A., & Chafee, M. E. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio*, 5, e00613.
159. Manigundan, K., Radhakrishnan, M., Kishore Kumar, A., & Jerrine, J. (2022). Actinobacteria as a source of biofertilizer/biocontrol agents for bioorganic agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), lxac047.
160. Marulanda, M.L., A.M.1 López and S.B. Aguilar (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breed. App. Biotech.*, 7, 242-252.
161. Matos, C. K. de, Pereira, C. E. L., Balena, L., & Kawakami, J. (2020). Effect of agar concentration in culture medium on *in vitro* development of potato plants. *Research, Society and Development*, 9(7), e542974571.
162. Mehta, U. J., Krishnamurthy, K. V., & Hazra, S. (2000). Regeneration of plants via adventitious bud formation from zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Current Science*, 78, 123-1234.
163. Mello, L., Santos, A., Santos, R., Kandasamy, S., Lazarovits, G., & Rigobelo, E. (2020). Application of the bacterial strains *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* and *Enterococcus faecium* for growth promotion in maize and soybean plants. *Australian Journal of Crop Science*, 14(12), 2020-2027.
164. Merlich, A. G., Zhunko, I. D., Limanska, N. V., & Ivanytsia, V. O. (2017a). Antagonistic activity against plant pathogenic bacteria and ability to biofilm formation of *Enterococcus italicus* ONU547 bacteria and their consortia with *Lactobacillus plantarum*. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University, Series Biology*, 29, 71-76.
165. Merlich, A. G., Zhunko, I. D., Limanska, N. V., & Ivanytsia, V. O. (2017b). Antagonistic activity of metabolic products of bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus italicus* with joint action against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology*, 3, 45-54.

166. Merlich, A., Galkin, M., Choiset, Y., Limanska, N., Vasylieva, N., Ivanytsia, V., & Haertlé, T. (2019). Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. *Folia Microbiologica*, 64(4), 535-545.
167. Michavila, G., Alibrandi, P., Cinà, P., Welin, B., Castagnaro, A. P., Chalfoun, N. R., Noguera, A. S., Puglia, A. M., Ciaccio, M., & Racedo, J. (2022). Plant growth-promoting bacteria isolated from sugarcane improve the survival of micropropagated plants during acclimatization. *Italian Journal of Agronomy*, 17(2).
168. Mohamad, M. E., Awad, A. A., Majrashi, A., Esadek, O. A. A., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., & Gendy, A. S. (2022). *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of *Paulownia* species (*Paulownia* hybrid and *Paulownia tomentosa*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1598-1603.
169. Msimbira, L. A., Naamala, J., Antar, M., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2022). Effect of Microbial Cell-Free Supernatants Extracted From a Range of pH Levels on Corn (*Zea mays* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed Germination and Seedling Growth. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 789335.
170. Muhammad Zia-Ul-Haq, R. Muhammad, De Feo, V., Z. E., Hawa, J., & Marius, M. (2014). *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules*, 19, 10998-11029.
171. Munaf, A.M., Mohameed, A.A., & Alkhalifa, A.S. (2022). Micropropagation of *Paulownia tomentosa* (Thumb. Steud.) by tissue culture. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 9(1), 575-591.
172. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15(3), 473-497.
173. Musa, Z., Ma, J., Egamberdieva, D., Abdelshafy Mohamad, O. A., Abaydulla, G., Liu, Y., ... & Li, L. (2020). Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Endophytic Actinobacteria Associated With the Medicinal Plant *Thymus roseus*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 191.

174. Nafis, A., Raklami, A., Bechtaoui, N., El Khalloufi, F., El Alaoui, A., Glick, B. R., Hafidi, M., Kouisni, L., Ouhdouch, Y., & Hassani, L. (2019). Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. *Diversity*, 11(8), 139.
175. Ndakidemi, C. F., Mneney, E., & Ndakidemi, P. A. (2014). Effects of Ascorbic Acid in Controlling Lethal Browning in *in vitro* Culture of *Brahylaena huillensis* Using Nodal Segments. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 187-191.
176. Nehl, D. B., Allen, S. J., & Brown, J. F. (1996). Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 5(1), 1-20.
177. Nowak, J. (1998). Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34, 122-130.
178. Okkers, D. J., Dicks, L. M. T., Silvester, M., Joubert, J. J., & Odendaal, H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide *Lactobacillus pentosus* isolated from with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 726-734.
179. Omamor, I. B., Asemota, A., Eke, C. R., & Eziashi, E. (2007). Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). *African Journal of Agricultural Research*, 2, 534-537.
180. Oo, K. T., Oo, K. S., & Mon, Y. (2018). Establishment of efficient surface sterilization protocol on different types of field grown strawberry explants (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 7(3), 70-74.
181. Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2016). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 487-508.
182. Orozco-Mosqueda, M. d. C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 11(6), 1167.

183. Ostapchuk, A. M., Shtenikov, M. D., Ivanytsia, V. O. (2020) Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic-metabolomic profiling. Ukr. Biochem. J., 92(6), 154-164.
184. Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. Applied Soil Ecology, 86, 41-54.
185. Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2013b). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. Journal of Applied Microbiology, 115, 207-217.
186. Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., & Suh, J. W. (2013a). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 9621-9636.
187. Panigrahi, S., Lakshmi, K. A., Venkateshwarulu, Y., & Umesh, N. (2015). Biohardening of micropropagated plants with PGPR and endophytic bacteria enhances the protein content. Biotechnology and Bioforensics, Forensic and Medical Bioinformatics, 51-55.
188. Panwar, M., Tewari, R., & Nayyar, H. (2016). Native halo-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria *Enterococcus* and *Pantoea* sp. improve seed yield of Mungbean (*Vigna radiata* L.) under soil salinity by reducing sodium uptake and stress injury. Physiology and Molecular Biology of Plants, 22(4), 445-459.
189. Park, S. (2021). Plant Tissue Culture Techniques and Experiments (5th ed.). Academic Press.
190. Partida-Martinez, L. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: Fact or artifact? Frontiers in Plant Science, 2, 100.
191. Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3795-3801.
192. Pawełkowicz, M. E., Skarzyńska, A., Mróz, T., Bystrzycki, E., & Płańder, W. (2021). Molecular Insight into Somaclonal Variation Phenomena from

Transcriptome Profiling of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Lines. Plant Cell Tissue Organ Cult, 145, 239-259.

193. Pellegrini, M., Pagnani, G., Bernardi, M., Mattedi, A., Spera, D. M., & Gallo, M. D. (2020). Cell-Free Supernatants of Plant Growth-Promoting Bacteria: A Review of Their Use as Biostimulant and Microbial Biocontrol Agents in Sustainable Agriculture. Sustainability, 12(23), 9917.
194. Pillay, V. K., & Nowak, J. (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. Canadian Journal of Microbiology, 43, 354-361.
195. Podolich, O., Lashevskyy, V., Ovcharenko, L., Kozyrovska, N., & Pirttilä, A. M. (2009). *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues *in vitro* and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMGB163. Journal of Applied Microbiology, 106, 728-737.
196. Posposilova, J., Tichá, I., Kadleček, P., et al. (1999). Acclimatization of Micropropagated Plants to *Ex vitro* Conditions. Biologia Plantarum, 42, 481-497.
197. Pozoga, M., Olewnicki, D., Jablonska, L. (2019). *In vitro* propagation protocols and variable cost comparison in commercial production for *Paulownia tomentosa* × *Paulownia fortunei* hybrid as a renewable energy source. Applied Sciences, 9, 2272.
198. Pralay S. Gorai, Ranjan Ghosh, Sanjit Konra, Narayan Chandra Mandal (2021). Biological control of early blight disease of potato caused by *Alternaria alternata* EBP3 by an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* SEB1. Biological Control, 156, 104551.
199. Putri, R. E., Mubarik, N. R., Ambarsari, L., & Wahyudi, A. T. (2021). Antagonistic activity of glucanolytic bacteria *Bacillus subtilis* W3.15 against *Fusarium oxysporum* and its enzyme characterization. Biodiversitas, 22, 4067-4077.

200. Raaijmakers, J., De Bruin, I., & Nybroe, O. (2010). Natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 1037-1062.
201. Rahman, A., Rahman, F., & Rahmatullah, M. (2013). *In vitro* regeneration of *Paulownia tomentosa* Steud. plants through the induction of adventitious shoots in explants derived from selected mature trees, by studying the effect of different plant growth regulators. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 7(4), 259-268.
202. Raman, J., Kim, J. S., & Choi, K. R. (2022). Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 132-141.
203. Rangseekaew, P., Barros-Rodríguez, A., Pathom-aree, W., & Manzanera, M. (2021). Deep-Sea Actinobacteria Mitigate Salinity Stress in Tomato Seedlings and Their Biosafety Testing. *Plants*, 10, 1687.
204. Retnowati, D., Solihin, D. D., Ghulamahdi, M., & Lestari, Y. (2019). Characterization of sponge-associated actinobacteria with potential to promote plant growth on tidal swamp. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale*, 92(2), 8191.
205. Retnowati, D., Solihin, D., Ghulamahdi, M., & Lestari, Y. (2018). New information on the potency of sponge-associated actinobacteria as producer of plant growth-promoting bioactive compounds. *Malaysian Applied Biology*, 47, 127-135.
206. Rosenberg, E., Sharon, G., Atad, I., & Zilber-Rosenberg, I. (2010). The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 500-506.
207. Rout, M. E., Chrzanowski, T. H., Westlie, T. K., De Luca, T. H., Callaway, R. M., & Holben, W. E. (2013). Bacterial endophytes enhance competition by invasive plants. *American Journal of Botany*, 100, 1726-1737.
208. Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing

- isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4), 1503-1509.
209. Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 34, 635-648.
 210. Samaan, M., & Nasser, M. (2022). Micropropagation of Blackberry (*Rubus fruticosus*) cv. Karaka Black. Egyptian Journal of Horticulture, 49(2), 187-198.
 211. Samaras, A., Roumeliotis, E., Ntasiou, P., & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus subtilis* MBI600 Promotes Growth of Tomato Plants and Induces Systemic Resistance Contributing to the Control of Soilborne Pathogens. Plants (Basel), 10(6), 1113.
 212. Santhanam, R., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2015). In wild tobacco, *Nicotiana attenuata*, variation among bacterial communities of isogenic plants is mainly shaped by the local soil microbiota independently of the plants' capacity to produce jasmonic acid. Communicative & Integrative Biology, 8, e1017160.
 213. Saravanakumar, D. (2012). Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. In Bacteria in agrobiolgy: stress management (pp. 187-210).
 214. Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D., & Weckwerth, W. (2009). A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and *in vitro*-grown poplar plants revealed by metabolomics. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22, 1032-1037.
 215. Scholz, R., Vater, J., & Budiharjo, A. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Journal of Bacteriology, 196, 1842-1852.
 216. Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2008). Friends and foes: Streptomyces as modulators of plant disease and symbiosis. Antonie van Leeuwenhoek, 94, 11-19.
 217. Seliem, M. K., Abdalla, N. A., & El-Ramady, H. R. (2020). Response of *Phalaenopsis* Orchid to Selenium and Bio-NanoSelenium: *In vitro* Rooting and Acclimatization. Env. Biodiv. Soil Secur., 4, 277-290.

218. Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. FEMS Microbiology Letters, 342(2), 179-186.
219. Sessitsch, A., Hardoim, P., Doring, J., Weilharter, A., & Krause, A. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25, 28-36.
220. Shekhawat, M.S., Mehta, S.R., Manokari, M., Priyadharshini, S., Badhepuri, M.K., Jogam, P., Dey, A., & Rajput, B.S. (2021). Morpho-anatomical and physiological changes of Indian sandalwood (*Santalum album* L.) plantlets in *ex vitro* conditions to support successful acclimatization for plant mass production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 147, 423-435.
221. Shen, X.H., Wan, J.Z., & Luo, W.Y. (1990). Propagation *in vitro* of Chinese Gooseberry (*Actinidia chinensis*) through the development of axillary buds. Scientia Horticulturae, 42, 45-54.
222. Shin, J. H., Park, B. S., Kim, H. Y., Lee, K. H., & Kim, K. S. (2021). Antagonistic and plant growth-promoting effects of *Bacillus velezensis* BS1 isolated from rhizosphere soil in a pepper field. Plant Pathology Journal, 37(3), 307-314.
223. Shobha, G., & Kumudini, B. S. (2012). Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus* spp. on *Fusarium oxysporum*. International Journal of Applied Science and Engineering Research, 1(3), 463-474.
224. Short, K. C., Warburton, J., & Roberts, A. V. (1987). *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum to humidity. Acta Horticulturae, 212, 329-340.
225. Shtenikov, M. D., Ostapchuk, A.M., Vasylieva, N.Y., Luzhetskyy, A.M., Rückert, C., Kalinowski, J., & Ivanytsia, V.O. (2020). Characteristics of Genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 Strain Isolated from the Bottom Sediments of the Black Sea. Microbiological journal, 82(3), 14-21.
226. Silva, C. F. B., de Brito, T. L., Taniguchi, C. A. K., Lopes, L. A., Pinto, G. A. S., & de Carvalho, A. C. P. P. (2018). Growth-promoting potential of bacterial

- biomass in the banana micropropagated plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(11), 782-787.
227. Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian J. Biol. Sci.*, 11, 165-172.
 228. Soares, B.D.O., & Miranda, V.S. (2016). Rooting *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of citrus cultivars. *Revista de Ciencias Agrarias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 59(2), 144-151.
 229. Solano, M. C. P., Ruiz, J. S., Arnao, M. R., Castro, O. C., Tovar, M. E. G., & Bello, J. J. B. (2019). Evaluation of *in vitro* shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 25, 561-567.
 230. Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425-448.
 231. Sriskanda, D., Liew, Y.X., Khor, S.P., Merican, F., Subramaniam, S., & Chew, B.L. (2021). An efficient micropropagation protocol for *Ficus carica* cv. Golden Orphan suitable for mass propagation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38, 102225.
 232. Strafella, S., Simpson, D. J., Yaghoubi Khanghahi, M., De Angelis, M., Ganzle, M., Minervini, F., & Crecchio, C. (2021). Comparative genomics and *in vitro* plant growth promotion and biocontrol traits of lactic acid bacteria from the wheat rhizosphere. *Microorganisms*, 9(1), 78-93.
 233. Suada, E. P., Jasim, B., Jimtha, C. J., Gayatri, G. P., Radhakrishnan, E. K., & Remakanthan, A. (2014). Phytostimulatory and hardening period-reducing effects of plant-associated bacteria on micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51, 682-687.
 234. Svec, P., Vandamme, P., Bryndova, H., Holochova, P., Kosina, M., Maslanova, I., & Sedlacek, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1499-1505.

235. Taghizadeh, M., & Ganji Dastjerdi, M. (2021). Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L.. Ornamental Horticulture, 27, 68-77.
236. Talboys, P. J., Owen, D. W., & Healey, J. R. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. BMC Plant Biology, 14, 51.
237. Talla, S. K., Bagari, P., Manga, S., Aileni, M. & Mamidala, P. (2022). Comparative study of micropropagated plants of Grand Naine banana during *in vitro* regeneration and *ex vitro* acclimatization. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 42, 102325.
238. Tanaka, K., Fujiwara, K., & Kozai, T. (1992). Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. Acta Horticulturae, 319(3), 59-64.
239. Teixeira da Silva, J. A., Guly, A., Magyar-Tabori, K., Wang, M. R., Wang, Q.-W., & Dobránszki, J. (2019). *In vitro* tissue culture of apple and other *Malus* species: Recent advances and applications. Planta, 249, 975-1006.
240. Teixeira, G. M., Mosela, M., Nicoletto, M. L. A., Ribeiro, R. A., Hungria, M., Youssef, K., Higashi, A. Y., Mian, S., Ferreira, A. S., Gonçalves, L. S. A., Pereira, U. P., & de Oliveira, A. G. (2021). Genomic insights into the antifungal activity and plant growth-promoting ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. Frontiers in Microbiology, 11, 618415.
241. Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., Bailey, J. F., & Morra, M. J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Applied and Environmental Microbiology, 68(5), 2161-2171.
242. Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. Genome Biology, 14, 209.
243. Twaij, B.M., Jazar, Z.H., & Hasan, M.N. (2020). Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. International Journal of Plant Biology, 11(1).

244. Tytarenko, N., Stohnienko, O., & Tesliuk, N. (2023c). Impact of actinobacteria on the growth and acclimatization of micropropagated *Paulownia tomentosa* Steud. plants to *ex vitro* conditions. In Materials of Young Scientists International Conference. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University.
245. Tytarenko, N., Tesliuk, N., & Ivanytsia, V. (2023b). Optimization of the protocol for the *in vitro* establishment of *Paulownia tomentosa* Steud. South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, 14(1), 1-13.
246. Tytarenko, N., Tesliuk, N., Merlich, A., Haertlé, T., & Ivanytsia, V. (2023a). Impact of *Enterococcus italicus* ONU547 on the growth and acclimatization of micropropagated *Rubus fruticosus* L. and *Paulownia tomentosa* Steud. plants to *ex vitro* conditions. BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 104(3), 301-313.
247. Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Modification of nutrient medium composition for *in vitro* culture establishment of *Paulownia tomentosa*. In Conference Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology, June 15-17, 2022, Kyiv, Ukraine, 45. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine.
248. Uba, B., Okoye, E., Anyaeji, O., & Ogbonnaya, O. (2019). Antagonistic Potentials of Actinomycetes Isolated from Coastal Area of Niger Delta against *Citrus sinensis* (Sweet Orange) and *Lycopersicum esculentum* (Tomato) Fungal Pathogens. Research & Reviews: A Journal of Biotechnology, 9(1), 4-15.
249. Vacheron, J., Desbrosses, G., Boufaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science, 4, 356.
250. Vereecke, D., Burssens, S., Simon-Mateo, C., Inze, D., Van Montagu, M., Goethals, K., & Jaziri, M. (2000). The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. Planta, 210, 241-251.

251. Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Biocontrol and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica*. A. Juss. Journal of Basic Microbiology, 51(5), 550-556.
252. Vestberg, M., & Cassells, A. (2009). The use of AMF and PGPR inoculants singly and combined to promote microplant establishment, growth and health. In Symbiotic fungi (pp. 337-360).
253. Vujovic, T., Ruzic, D., & Cerovic, R. (2010). Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. Plant Growth Regulation, 61, 265-275.
254. Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., & Cui, H. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. FEMS Microbiology Letters, 341(1), 45-51.
255. Wang, K., Ngea, G. L. N., Godana, E. A., Shi, Y., Lanhuang, B., Zhang, X., ... & Zhang, H. (2021). Recent advances in *Penicillium expansum* infection mechanisms and current methods in controlling *P. expansum* in postharvest apples. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1-14.
256. Wang, S., Na, X., Yang, L., Li, M., Zhang, C., Wei, M., ... & Wei, L. (2021). *Bacillus megaterium* strain WW1211 promotes plant growth and lateral root initiation via regulation of auxin biosynthesis and redistribution. Plant and Soil, 466, 491-504.
257. Wang, S.Y., & Steffens, G.L. (1987). Effect of paclobutrazol on water stress induced abscisic acid in apple seedlings leaves. Plant Physiology, 84, 1051-1054.
258. Wang, Y., Liang, J., Zhang, C., Wang, L., Gao, W., & Jiang, J. (2020). *Bacillus megaterium* WL-3 lipopeptides collaborate against *Phytophthora infestans* to control potato late blight and promote potato plant growth. Frontiers in Microbiology, 11, 1602.
259. Wilson, D. (1995). Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, 73, 274-276.
260. Wu, H. C., & du Toit, E. S. (2004). Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides*. Scientia Horticulturae, 100, 355-358.

261. Xiao, Z., Jin, Zh., Zhang, B., Li, F., Yu, F., Zhanget, H., et al. (2020). Effects of IBA on rooting ability of *Cinnamomum bodinieri* citral type micro-shoots from transcriptomics analysis. *Plant Biotechnology Reports*.
262. Xie, X., Zhang, H., & Pare, P. W. (2009). Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant Signaling & Behavior*, 4, 948-953.
263. Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G., & Zhao, J. (2013). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Protection*, 43, 231-240.
264. Yadav, N., Vaidya, B., Henderson, K., Lee, J., Stewart, W., Dhekney, S., & Joshee, N. (2013). A review of Paulownia Biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *American Journal of Plant Sciences*, 4(11), 2070-2082.
265. Yamaura, M., Uchiumi, T., Higashi, S., Abe, M., & Kucho, K. (2010). Identification of *Frankia* genes induced under nitrogen-fixing conditions by suppression subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1692-1694.
266. Zabouri, Y., Cheriguene, A., Chougrani, F., Merzouk, Y., Marchetta, A., Urzì, C., & De Leo, F. (2021). Antifungal activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic *Alternaria alternata* species and their molecular characterization. *Journal of Food and Nutrition Research*, 60(1), 18-28.
267. Zarei, M., Alizadeh, M., Khorasaninejad, S., Khoshal Sarmast, M. (2023). Application of activated charcoal and carbon nanotubes on phenol exclusion from tissue culture media in Grapevine and Paulownia. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 1(36), 46-61.
268. Zhao, S., Du, C. M., & Tian, C. Y. (2012). Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber fusarium wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 2919-2927.

269. Zhao, S., Wang, H., Liu, K., Li, L., Yang, J., An, X., Li, P., Yun, L., & Zhang, Z. (2021). The role of JrPPOs in the browning of walnut explants. *Plant Biol.*, 21, 9.
270. Zhylovska, K.Y., Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Determination of the influence of actinobacteria on seed germination and morphometric parameters of maize sprouts. In *Materials of Young Scientists International Conference*, 111-115. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University.
271. Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95-102.
272. Ziv, M., & Halevy, A. (1983). Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *Hort. Sci.*, 18, 434-436.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті у фахових наукових виданнях**

1. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2023). Вплив актинобактерій на адаптацію до умов *ex vitro* та ріст мікроклонованих рослин *Rubus fruticosus* L. Мікробіологія і біотехнологія, 1(57), 18-41, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1\(57\).276078](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1(57).276078) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
2. Титаренко, Н. В., Теслюк, Н. І., & Іваниця, В. О. (2020). Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин. Мікробіологія і біотехнологія, 3, 6-31, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).214202](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).214202) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
3. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020). Удосконалення процесів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі. Мікробіологія і біотехнологія, 2, 72-84, DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2\(49\).209806](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2(49).209806) (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

Статті в зарубіжних виданнях

4. Tytarenko, N., Tesliuk, N., Merlich, A., Haertlé, T., & Ivanytsia, V. (2023). Impact of *Enterococcus italicus* ONU547 on the growth and acclimatization of micropropagated *Rubus fruticosus* L. and *Paulownia tomentosa* Steud. plants to *ex vitro* conditions. BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 104(3), 301-313, DOI: <http://doi.org/10.5114/bta.2023.130732> (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).

5. Tytarenko, N., Tesliuk, N., & Ivanytsia, V. (2023). Optimization of the protocol for the *in vitro* establishment of *Paulownia tomentosa* Steud. South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment, 14(1), 1-13 (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії статті, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).

Матеріали та тези доповідей конференцій, з'їздів

6. Tytarenko, N., Stohnienko, O., & Tesliuk, N. (2023). Impact of actinobacteria on the growth and acclimatization of micropropagated *Paulownia tomentosa* Steud. plants to *ex vitro* conditions. In Materials of Young Scientists International Conference. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
7. Zhylovska, K.Y., Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Determination of the influence of actinobacteria on seed germination and morphometric parameters of maize sprouts. In Materials of Young Scientists International Conference, 111-115. Odesa: Odesa I. I. Mechnikov National University (*особистий внесок здобувача – аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
8. Tytarenko, N.V., & Tesliuk, N.I. (2022). Modification of nutrient medium composition for *in vitro* culture establishment of *Paulownia tomentosa*. In Conference Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology, June 15-17, 2022, Kyiv, Ukraine, 45. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (*особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку*).
9. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2021). Використання препаратів фунгіцидної дії для запобігання контамінації під час введення рослин в культуру *in vitro*. Міжнародний науковий журнал «Грааль науки», 7, 131-133.

10. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2020). Використання аскорбінової кислоти для процесу введення рослин в культуру *in vitro*. У Гуманітарні та природничі науки: актуальні питання: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 23-24 жовтня 2020, 40-44. Херсон: Видавництво «Молодий вчений» (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
11. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018). Використання штамів *Bacillus megaterium* та *Enterococcus italicus* для мікроклонального розмноження рослин. У Теорія і практика актуальних наукових досліджень: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, м. Одеса, 28-29 квітня 2018, 39-41. Херсон: Видавництво «Молодий вчений» (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
12. Титаренко, Н. В., & Теслюк, Н. І. (2018). Адаптація мікроклонів ожини (*Rubus caesius*) до умов *in vivo* з використанням культур мікроорганізмів. У Актуальні питання сучасної науки: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, част. II, м. Київ, 29-30 квітня 2018, 63-65. Київ: МЦНД (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту, ілюстративного матеріалу, підготовка до друку).
13. Титаренко, Н. В. (2017). Оптимізація клонального мікророзмноження ожини в культурі *in vitro*. У Інноваційні технології та інтенсифікація національного виробництва: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, частина 1, Тернопіль, 187-189. Тернопіль: Крок (особистий внесок здобувача – проведення експериментів, аналіз даних, підготовка робочої версії тексту).

Патенти на винахід

14. Іваниця, В. О., Штеніков, М. Д., Остапчук, А. М., Горшкова, О. Г., Теслюк, Н. І., Титаренко, Н. В., & Гудзенко, Т. В. (2023). Пат. 126710 України МПК

A01N63/22. Штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю. Київ: Національний орган інтелектуальної власності - державна організація “Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій”. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1718149/> (особистий внесок здобувача – проведення експериментів за встановлення впливу *B. velezensis* ONU553 на адаптацію мікроклонованих рослин, аналіз даних, підготовка частини тексту).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для поверхневої стерилізації експлантів з метою зниження ступеня грибкової контамінації та підвищення приживлюваності рекомендовано використовувати: для павловнії – фунгіцидний препарат Хорус (1,4 г/л), для експлантів ожини – препарат Скор (1 мл/л).
2. На етапі введення в культуру *in vitro* для підвищення приживлюваності, прискорення проліферації та покращення біометричних показників мікроклонів рекомендовано додавати у склад середовища МС аскорбінову кислоту у концентрації 50 мг/л – для павловнії, та 100 мг/л – для ожини.
3. Під час введення в культуру *in vitro* рекомендовано використовувати або напіврідке агаризоване середовище із 0,4% агару, або середовище із 7% кукурудзяного крохмалю у ролі желуючого агенту, що позитивно впливає на строки проліферації, приживлюваність та біометричні характеристики рослин у порівнянні з культивуванням на твердому агаризованому середовищі із 0,8% агару.
4. На етапі стерильного живцювання рекомендовано використовувати наступні співвідношення регуляторів росту для отримання найбільшої кількості сформованих пагонів та вузлів: для павловнії – 2,0 мг/л БАП+0,5 мг/л ІОК, для ожини – 1,5 мг/л БАП+0,5 мг/л НОК. Також на цьому етапі рекомендовано використання кукурудзяного крохмалю (7%) у ролі альтернативного економічного желуючого агенту для живцювання павловнії та ожини.
5. На етапі укорінення *in vitro* мікроклонів павловнії також рекомендоване використання 7% кукурудзяного крохмалю як альтернативи більш вартісному агару.
6. На етапі адаптації до умов *ex vitro* рекомендована моноінокуляція ризосфери мікроклонів павловнії бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500; мікроклонів ожини – бактеріями штаму *B. velezensis* ONU553.