

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ННІ лісового і садово-паркового господарства

УДК 635.914:57.085.2

ПОГОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Директор ННІ лісового і садово-
паркового господарства

Завідувач кафедри ботаніки,
дендрології та лісової селекції

Лаєнда П.І. Марчук Ю.М.
« » 2021 р. « » 2021 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему: «Особливості отримання садивного матеріалу орхідей методом *in vitro*
на прикладі *Phalaenopsis Blume*»

Спеціальність – 206 «Садово-паркове господарство»

Освітня програма – «Садово-паркове господарство»

Орієнтація освітньої програми – освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

док. с.-г. наук., професор
(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Ковалевський С.Б.
(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

канд. біол. наук., доцент
(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Білоус С.Ю.
(ПІБ)

Виконала

(підпис)

Пацьора Н.В.
(ПІБ)

Київ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ ІНІ лісового і садово-паркового господарства

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
ботаніки, дендрології та лісової селекції
канд. с.-г. наук, доц. Ю.М. Марчук
« » 2021 р.

ЗАВДАННЯ ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

ПАЦЬОРИ НАТАЛІЇ ВОЛОДИМИРІВНИ

Спеціальність – 206 «Садово-паркове господарство»

Освітня програма – «Садово-паркове господарство»

Орієнтація освітньої програми – освітньо-професійна

Тема магістерської роботи: «**Особливості отримання садивного матеріалу орхідей методом *in vitro* на прикладі *Phalaenopsis Blume***» затверджена наказом ректора НУБіП України від «19» 11 2020 р.» № 1826 «О»

Термін подання завершеної роботи на кафедру: 15.11.2021 року.

Вихідні дані до випускної магістерської роботи: літературні джерела, електронні ресурси, нормативно-довідкові матеріали.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Ботанічна, біологічна та морфо-фізіологічна характеристика об'єкту дослідження.
2. Аналітичний огляд літератури з проблем мікроклонального розмноження орхідних.
3. Узагальнення методичних підходів, використаних у роботі.
4. Введення в культуру *in vitro*, первинний морфогенез, безпосередньо мікроклональне розмноження та ризогенезу в культурі *in vitro* *Phalaenopsis Blume*.

Дата видачі завдання «15 вересня» 2020 р.

Керівник магістерської роботи

(підпис)

к. б. н., доцент Білоус С.Ю.

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняла до виконання

(підпис)

Пациора Н.В.

(прізвище та ініціали студента)

НУБІП УКРАЇНИ

РЕФЕРАТ

Orchidaceae – одні з найбільших родин квіткових рослин. Унікальна

Phalaenopsis добре відома у всьому світі рослина, які вирощують через їх декоративність *Phalaenopsis* Blume. Переваги методу мікроклонального розмноження рослин незаперечні, особливо у промисловому квітникарстві.

Мета роботи – дослідження особливостей мікроклонального розмноження рослин *Phalaenopsis* Blume, що належать до роду *Orchidaceae* в цілях збереження унікальних генотипів й використанні в квітникарстві.

Для досягнення мети було поставлено наступні задачі:

- визначення об'єктів та відбір найбільш придатних експлантів для подальших досліджень;

- підбір типу експланту, оптимального способу стерилізації *Phalaenopsis* Blume;

- оптимізація складових живильного середовища для регенерації первинних мікропагонів та зародкоподібних структур *in vitro*;

- дослідження впливу складових живильного середовища та умов культивування на етапі масового розмноження рослин *Phalaenopsis* шляхом прямого морфогенезу *in vitro*;

- підбір регуляторів росту для індукції ризогенезу рослин-регенерантів *Phalaenopsis* в культурі *in vitro* та їх адаптації умов закритого ґрунту.

Об'єкт дослідження: рослина *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume в умовах *in vitro*.

Предмет дослідження: мікроклональне розмноження й морфогенез рослин *Phalaenopsis* Blume на різних етапах розвитку в культурі *in vitro* та *ex vitro*.

Методика дослідження. Для виконання досліджень усі роботи з культурою тканин та органів *in vitro* здійснювали за загальноприйнятими в біотехнології методами.

У роботі проведено дослідження особливостей отримання адаптованих рослин-регенерантів *Phalaenopsis* Blume з використанням мікроклонального розмноження з метою їх масового розмноження й збереження рідкісних

екземплярів в умовах *ex vitro*. Досліджено особливості органогенезу та регенерації цілого організму з культивованих тканин та органів представників *Phalaenopsis* Blume. Визначено оптимальні умови прямого морфогенезу, ризогенезу *in vitro* та адаптації рослин до умов закритого ґрунту.

За результатами проведених досліджень розроблена методика мікроклонального розмноження, яка може використовуватись як базова для розмноження різних представників орхідних.

Отриманий однорідний садивний матеріал можна використовувати у квітникарстві, створенні флораріумів та з метою збереження рідкісних рослин.

Загальна характеристика роботи: За темою наукової роботи опубліковано тези доповідей на наукових міжнародній конференції.

Наукова робота виконана у співпраці з кафедрою екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Ключові слова: *Phalaenopsis* Blume, культура, *in vitro*, мікроклональне розмноження, морфогенез, ризогенез.

ЗМІСТ	
Перелік скорочень, умовних позначок, символів, одиниць і термінів	6
ВСТУП	7
1 РОЗДІЛ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Історія поширення й морфо-фізіологічна характеристика <i>Phalaenopsis</i> Blume	9
1.2. Способи вегетативного розмноження <i>Phalaenopsis</i> Blume	15
1.3. Використання в фітодизайні та озелененні	21
1.4. Теоретичні і прикладні основи мікроклонального розмноження	25
1.5. Сучасний стан досліджень культури клітин, тканин та органів ...	27
2 РОЗДІЛ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	31
2.1. Об'єкти дослідження	31
2.2. Відбір та стерилізація експлантів <i>Phalaenopsis amabilis</i> Blume ..	32
2.3. Етапи і методи мікроклонального розмноження	35
2.3.1. Способи стерилізації в культурі тканин та органів	36
2.3.2. Отримання асептичної культури рослин	39
2.3.3. Технологія приготування маточних розчинів й живильних середовищ	41
2.3.4. Підбір умов культивування для масового мікроклонального розмноження	48
2.3.5. Укорінення та адаптація садивного матеріалу <i>in vitro</i> до умов <i>ex vitro</i>	49
3 РОЗДІЛ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН <i>PHALAEOPSIS</i> BLUME В КУЛЬТУРІ <i>IN</i> <i>VITRO</i>	52
3.1. Особливості введення в культуру <i>in vitro</i> <i>Phalaenopsis</i> Blume ..	52
3.2. Дослідження впливу компонентів живильного середовища на індукцію морфогенезу <i>in vitro</i> <i>Phalaenopsis</i> Blume	56
3.3. Вивчення впливу регуляторів росту на процес укорінення мікропагонів рослин <i>Phalaenopsis</i> Blume в культурі <i>in vitro</i>	62
3.4. Добір оптимального режиму адаптації рослин-регенерантів <i>Phalaenopsis</i> Blume до умов закритого ґрунту	63
ВИСНОВКИ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	67

НУБІП України

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧОК, СИМВОЛІВ,
ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

МКР – мікроклональне розмноження

ЖС – живильне середовище

in vitro – спеціально створені асептичні умови

РР – рослина-регенерант

МС – середовище Мурасіге і Скуга

РРР – регулятори росту рослин

БАП – 6-бензиламінопурин

НОК – α -Нафтилоцтова кислота

ІОК – Індоліл-3-оцтова кислота

ТДЗ – Тідазурон

2,4 Д – 2,4-дихлорфеноксі-оцтова кислота

2ір – 2-ізопентеніладеніну

NaHClO – гіпохлорид натрію

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Ринок орхідей – найбільший серед кімнатних рослин. За останні 20 років декоративні орхідеї роду *Phalaenopsis* Blume, стали найбільш вживаними кімнатними рослинами і елементами фітодизайну в світі.

Орхідеї вирощують як декоративні рослини і цінують як зрізані квіти не лише через їх екзотичність краси, але також їх тривалого терміну зберігання.

Велика частина декоративних орхідей виробляється в США, Китаї, Таїланді й Голландії в штучних умовах з використанням техніки *in vitro*. В Україні виробництво орхідей не розвинене й становить значний як масового розмноження так й адаптація існуючих і розробка нових технологій культивування цінних декоративних культиварів.

Основними методами розмноження орхідей при виробництві в промислових масштабах є насінневе розмноження в стерильних умовах та мікроклональне розмноження. Перевагою генеративного способу розмноження є висока ефективність, але в свою чергу недоліком є втрата генотипових ознак й неконтрольована поява фенотипових проявів майже у 50% нащадків.

Використовуючи автовегетативне розмноження, а саме мікроклональне розмноження, зберігаються декоративні якості, можливо розмножувати особливо цінні гібридні форми у великих кількостях, незалежно від сезону тощо.

Таким чином мікроклональне розмноження дозволяє забезпечити якість садивного матеріалу і значно скоротити витрати на виробництві, є найефективнішим для отримання садивного матеріалу орхідних в промислових масштабах, для потреб квітництва.

Структура та обсяг магістерської роботи.

Випускна магістерська робота складається з 3 розділів, в яких окрім текстової частини наведені 10 таблиць, 27 рисунка та 75 джерел використаної літератури з яких іншомовних 18.

Загальний обсяг роботи складає 73 сторінок комп'ютерного тексту.

НУБІП України

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Багато тропічних і субтропічних орхідей надзвичайно декоративні та становлять інтерес як цінні квіткові культури та рідкісні види. Для збереження генофонду представників *Orchidaceae* Juss. Особливе значення набуває розробка способів культивування цінних екземплярів [10, 39], що дає можливість не лише збереження виду у природі, а й масово розмножувати цінні сорти й використовувати у квітникарстві, озелененні, декоруванні та дизайні.

Комплексне вивчення і збереження генетичних ресурсів природної флори нині є одним із основних завдань ботанічних садів у збереженні біологічного різноманіття. Особливу актуальність приділяється збереженню видів, природне поновлення яких в природі ослаблене або складне. До таких видів відносяться представники сімейства *Orchidaceae* Juss. тропічних і субтропічних широт [58].

Питання інтродукції рослин тропічної і субтропічної флори в ботанічних садах дозволяє проводити всебічне вивчення біології росту і розвитку видів, а також розробляти способи їх приєкореного розмноження.

Вивчення репродуктивної біології орхідних є важливою передумовою збереження тропічних орхідей в культурі. Культивування тропічних орхідей в штучних умовах і застосування методики експериментального запилення дають можливість зменшити ряд лімітуючих факторів репродукції рослин у природі, в першу чергу таких, як наявність запилювачів і нестача ресурсів [1, 45].

Експериментальне запилення дозволяє маніпулювати такими показниками, як час запилення квітки, його розташування на квітконосі тощо. Більше того, розмноження рослин в умовах оранжереї дозволяє контролювати параметри (рівень вологості, температура, освітленість), що вагомо впливає на ефективність результат запилення та розмноження. Вивчення біологічних особливостей видів роду *Phalaenopsis* Blume при вирощуванні в оранжереях ботанічних садів є актуальним.

Вчені та дослідники показали, що при інтродукції змінюються лінійні розміри рослин, їх листків, квіток, суцвіть і плодів, а також їх кількість та якісні

характеристики [26, 42]. Такі зміни відмічали й інші дослідники в процесі багаторічних спостережень за рідкісними і зникаючими видами рослинної флори України [15, 16, 42].

1.1. Історія поширення й морфо-фізіологічна характеристика *Phalaenopsis Blume*

Orchidaceae Juss. — це найбільша родина покритонасінних рослин, яка нараховує близько 750 родів і від 17 000 до 35 000 видів [11, 62]. Найчисленніші епіфітні орхідні у тропічних і субтропічних областях. Центром родової і видової різноманітності орхідей є тропічна Америка, що налічується до 306 родів, які об'єднують 8266 видів [50].

Орхідні – космополіти, вони поширені майже в усіх регіонах земної кулі, але більшість видів зростає у тропічних широтах. Виділяють такі життєві форми орхідних: наземні, епіфітні, літофітні та ті, що ростуть під землею [64]. Флора України нараховує 70 видів орхідних із 28 родів [44, 55]. Рідкісність орхідей та скорочення їхньої чисельності зумовлені як впливом природних чинників (відсутність у біотопі грибів-мікоризоутворювачів і специфічних комах-запилювачів), так і антропогенною дією [55].

Перші згадки про культуру орхідей зустрічаються ще за 2500 років до н.е. в Китаї. Перший представник цього роду був знайдений німецьким мандрівником і натуралістом Георгом Румпфіусом. У 1752. шведський пастор Петер Осбек знайшов ще одну рослину і послав гербарій Карл Лінней, що описав його в своїй знаменитій праці "Види рослин" під ім'ям епідендрум чарівний *Epidendrum amabilis* L., Слово "епідендрум" в перекладі з Давньогрецький означає «живе на дереві».

Phalaenopsis в перекладі з грецького означає «подібний метелику». У 1825 році директор Лейденського Ботанічний саду Карл Блюмі, знайшов ще одну рослину на маленькому островці Малайського архіпелагу. Розглядаючи джунглі в сутінки в польовий бінокль, він прийняв орхідеї за білих нічних метеликів. На згадку про свою помилку Блюм назвав рід *Phalgenopsis*, що означає "подібний

метелику" [25]. Рослини відомі також під назвою "Малайський квітка" і "орхідея-метелик".

Рослини з Південно-Східної Азії, Філіппін, островів Тихого океану і північного сходу Австралії, що ростуть на висоті 200-400 метрів над рівнем моря в кронах дерев або іноді на скелях в тропічних лісах [18, 55].

Майже всі *Phalaenopsis* – епіфіти [17, 25] рослини, в природних умовах вони ростуть на стовбурах і гілках дерев (рис. 1.1). Вологстю, мінеральними і органічними речовинами їх забезпечують численні фотосинтезуючі повітряні коріння, якими вони кріпляться до кори дерев і рослинним залишкам скупчуються в розвилках гілок.



Рис. 1.1. Зростання *Phalaenopsis* в природних умовах

Родова назва *Phalaenopsis*, що означає «метеликоподібний» (грец. *Phalaena* – метелик, грец. *opsis* – «подібність»).

Рослина з моноподіальним стеблом, що формує головне стебло, яке росте вгору року і утворює нове листя на верхівці. Немає коренів, не формує псевдобульб (потовщена надземна частина стебла орхідних, яка служить рослинам для запасу води і поживних речовин) з сильно укороченим стеблом, що утворює 4-5 дворядно розташованих м'ясистих, блискучих листків

НУБІП УКРАЇНИ

подовжено-еліптичної форми. У природі листя може досягати 50 см в довжину. У культурі листя, як правило, менше — від 15 до 30 см при ширині 5-10 см. У фаленопсеа верхівкова брунька зберігається протягом усього життя пагона, і

він, таким чином, має необмеженим ростом в довжину [44, 78]. Листки орхідей з

НУБІП УКРАЇНИ

місць проживання з вираженим сухим періодом, як правило, м'ясисті, й виконують запасуючу функцію, дозволяють контролювати і підтримувати загальний водний баланс рослини, збираючи і випаровуючи вологу з повітря.

Також тканини листків служать своєрідним резервуаром для запасу і зберігання

рідини у випадках короткострокових періодів посухи. Листочки орхідей, як і

НУБІП УКРАЇНИ

інших рослин, активно беруть участь в дихальному процесі за допомогою фотосинтезу, отримуючи вуглекислий газ і сонячне світло, виділяючи потім кисень.

Квітконіс похилений, довжиною до 80 см. Суцвіття китицеподібне, багатоквіткове, довжиною до 50 см. У суцвітті 10-20 квіток [51, 71].

НУБІП УКРАЇНИ

Квітки білі, великі, 7-10 см в діаметрі, розташовані на квітконосі двома рядами, нагадують зграйку метеликів, у деяких форм ароматні. Чапюлистки і пелюстки молочно-білі, губа, що має червоні рисочки на білому фоні, закінчується двома тонкими звивистими вусиками. Протягом року

НУБІП УКРАЇНИ

спостерігається два періоди цвітіння — з листопада по лютий і з травня по липень. Тривалість цвітіння 3-4 місяці.

Плід — еліптично-подовжена, блискуча, ребриста коробочка жовтого кольору. Довжина плоду 6-7 см, діаметр 1-1,5 см. Плідоніжка відпадає разом з плодом, а сам плід дозріває протягом 120—150 днів.

НУБІП УКРАЇНИ

У *Phalaenopsis* крім підземних коренів мають і повітряні, що ростуть над землею. Вони дещо товщі звичайних, плоскі і циліндричної форми. Повітряні корені також покриті веламеном, за допомогою якого вони добувають корисні речовини з навколишнього середовища. Коріння орхідей складаються з

НУБІП УКРАЇНИ

внутрішньої жорсткої серцевини, яка переносить поживні речовини, і зовнішнього шару, він є пористим матеріалом і поглинає воду, добрива, і кисень [34]. Здорові кінчики коренів яскраво-зелені. Чим більше зелена частина,

тим швидше корінь росте.

Функція коренів орхідей: поглинання води (Коли коріння намокають, веламен діє як губка, насичуючись водою, щоб напсіти рослина), Кріплення до субстрату (Повітряне коріння, закріплюючись на поверхні, можуть стає плоскими, щоб забезпечити більшу площу кріплення. Коріння кріпляться до субстрату так добре, що з часом може бути дуже важко їх від'єднати.), газообмін (Використовуються спеціальні повітроспройні субстрати для забезпечення проходження достатньої кількості повітря навколо коренів.), фотосинтез (функція деяких коренів – фотосинтез, тому ви часто бачите, що орхідеї вирощують в напівпрозорих горщиках.), тимчасове зберігання (багато коріння також забезпечують тимчасове зберігання поживних речовин і води) [28, 74].

Квітконоси і повітряні корені виходять із проміжків між листям, слідує один за одним, рік за роком. Згодом ріст стебла сповільнюється і зовсім припиняється при старінні і відмирання рослини.

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume – фаленопсис приймний або фаленопсис чарівний – епіфітна трав'яниста рослина, вид роду фаленопсис родини орхідні (рис. 1.2).



Рис. 1.2. *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume [45]

Один із природних видів роду з Листки видовженими повздовжно-яйцеподібними листками та найкрупнішими квітками, від 6 до 10 см у діаметрі, білого кольору, родом із Північно-Східної Австралії, Новій Гвінеї, зростає в дощових тропічних лісах, уздовж морських узбереж, іноді на мангрових деревах.

Phalaenopsis equestris Schauer Rchb.f. – фаленопсис еквестрис, або кінний (рис. 1.3). Родом з Південно-Східної Азії. Листки подовжено-еліптичні, 7-10 см завдовжки і 3-5 см шириною. Суцвіття – багатоквіткове й складається з 5-11 дрібних квіток, 3-4 см в діаметрі, бузково-рожевого кольору, розташовані двома супротивними рядами



Рис. 1.3. *Phalaenopsis equestris* Schauer Rchb.f. [45]

Phalaenopsis lueddemanniana Rchb.f. – фаленопсис Люддемана (рис. 1.4.). Батьківщиною цього виду є Філіппіни. Листя довгасті у кількості 5-6 шт., довжиною 10-20 см. Квітконіс налічує 5-7 невеликих квіток, 4-5 см в діаметрі з численними поперечними аметистового-пурпуровими, а у верхній половині – біло-рожевими смугами на білому тлі.



Рис. 1.4. *Phalaenopsis lueddemanniana* Rchb.f. [45]

Phalaenopsis hybridum Dausse Gessica – садовий гібрид (рис. 1.5.). Листки подовжено-еліптичні, розташовані на стеблі двома супротивними рядами, темно-

зелені, м'якоти. Суцвіття – багатоквіткова кисть. Квітки великі, 7-11 см в діаметрі, насиченого рожевого кольору, від 5 до 9 квіток в суцвітті.



Рис. 1.5. *Phalaenopsis hybridum* 'Danse Gessica'

Перераховані вище орхідеї відносяться до теплолюбних видів [45].

З метою виявлення адаптаційних особливостей інтродуцентів в ботанічних садах, оранжереях, лабораторіях проводились роботи по вивченню сезонних ритмів розвитку орхідей. За результатами спостережень з'ясувалось, що закладання квітконосу в *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume спостерігається в другій половині вересня, зростання квітконоса триває до другої половини листопада, в цей час спостерігається і фарбування бутонів. Цвітіння починається з другої декади грудня і триває до першої декади березня. Довжина квітконоса *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume коливається від 40 до 60 см, квітки чисто білі до 11 см в діаметрі. Тривалість цвітіння одного квітконоса коливається від 60 до 70 днів [68].

При вирощуванні фаленопсиса *Phalaenopsis equestris* 'Schauer' Rchb.f. і *Phalaenopsis equestris* 'Schauer' Rchb.f. в оранжереях відмічено, що закладання квіткових бруньок спостерігається в другій половині серпня. Зростання квітконосу у *Phalaenopsis equestris* 'Schauer' Rchb.f. триває до першої декади жовтня. Фарбування бутонів відбувається в цей же період.

Цвітіння даного виду починається з другої декади жовтня і триває до середини січня. Довжина квітконоса *Phalaenopsis equestris* 'Schauer' Rchb.f.

коливається від 15 до 25 см, квітки бузково-рожеві до 3 см в діаметрі. У суцвітті налічується від 5 до 11 шт. Тривалість цвітіння одного суцвіття коливається від 40 до 50 днів. Зростання квітконосу *Phalaenopsis hybridum 'Danse Gessica'* триває до третьої декади листопада, в цей час спостерігається і фарбування бутонів.

Висота квітконоса даного виду становить в середньому 40 см. Зазвичай квітконіс несе від 5 до 9 квіток насиченого рожевого кольору. Діаметр квітки зазвичай становить 7-9 см. Тривалість цвітіння одного квітконоса коливається від 50 до 70 днів [45, 60].

Закладка квітконосу у *Phalaenopsis lueddemanniana* Rchb.f. відбувається в першій декаді березня, зростання квітконоса триває в міру розпускання квіток по першу декаду липня. Довжина квітконоса даного виду *Phalaenopsis Blume* не перевищує 10 см, квітки до 3 см в діаметрі, білі з яскравими коричнево-бузковими поперечними смужками. Загальна кількість квіток налічує 5-6 шт.

Такі дослідження важливі, адже дають можливість зрозуміти, термінами цвітіння, зокрема за цими даними *Ph. equestris* і *Ph. hybridum* відносяться до орхідей осінньо-зимового періоду цвітіння, *Ph. amabilis* - до орхідей зимового періоду цвітіння, а *Ph. lueddemanniana* - до орхідей літнього періоду цвітіння [73, 75].

1.2. Способи вегетативного розмноження *Phalaenopsis Blume*

Рідкісність орхідей, скорочення їх чисельності зумовлені як впливом природних чинників (відсутністю у біотопі грибів-мікоризо-утворювачів і специфічних комах-запилювачів), так і антропогенною дією [25, 28, 33, 35, 59].

Нині орхідеї перебувають на стадії активної еволюції, що підтверджується будовою генеративної сфери в особин одного виду і значною кількістю міжвидових та міжродових гібридів. Вегетативні органи консервативніші, їх будова характеризує пристосованість рослин до кліматичних, едафічних і фітоценотичних умов існування, що виникла у процесі еволюції [34, 59].

Вегетативного та насінневого розмноження, проте для відновлення популяцій природного відтворення недостатньо у зв'язку з їх біокологічними особливостями [65]. Актуальною є розробка методів прискореного розмноження, введення у культуру, репатріація цих видів у природу, а також створення генетичних банків і колекцій для збереження і розширення генофонду. Незважаючи на те, що вже накопичений великий досвід розмноження орхідей і проведені численні фундаментальні і прикладні дослідження, поки що не всі види піддаються успішному розмноженню штучним шляхом [43, 65]. Тому вивчення репродуктивних особливостей орхідних помірної зони залишається актуальним [37, 43].

Традиційно *Phalaenopsis* розмножують поділом відростків, однак при використанні цього методу коефіцієнт розмноження є низьким та спостерігається гальмування росту материнської рослини, що робить його неефективним для масового виробництва. Тому вчені всього світу намагаються удосконалити методи розмноження *Phalaenopsis*, щоб збільшити кількість садивного матеріалу. Одним з методів розмноження, який користується попитом у промисловості є насінневий метод, однак для пророщування насіння потрібні спеціальні умови, а саме культивування на штучних живильних середовищах в повністю стерильних умовах [5, 8]. У промислових лабораторіях, які займаються лише вирощуванням *Phalaenopsis*, є спеціальна людина, яка виконує роль комахи-запилювача. Така людина у період цвітіння проводить зачленення квіток в теплиці, отримуючи нові види рослин. Через 6-9 місяців готову коробочку (стручок) з насінням можна використовувати для стерилізації та отримання протокормів (початковий етап у формуванні рослини) (рис. 1.6.).



Рис. 1.6. Стручок із насінням

Розведення фаленопсис за допомогою насіння складно, тому що в них немає поживних елементів. Щоб забезпечити поділ клітин, потрібні вуглеводи. Також їм потрібні мікроорганізми, щоб рости і розвиватися. Вони будуть забезпечувати їх поживними елементами, зокрема мінеральними [9, 27].

Спосіб розмноження насінням – один з найскладніших способів, раніше це вважалося неможливим. Основні причини, чому спосіб використовується рідко й займає багато часу і сил:

- Насіння орхідеї дуже мале і побачити його неозброєним оком практично неможливо;

- У них відсутній ендосперм, це тканина, що оточує зародок, який живить його і не дає зовнішнім чинникам пошкодити зародок. Будь-яка взаємодія з навколишнім середовищем, захворювання або відхилення від норм догляду призводить до загибелі рослин.

Для того щоб отримати насіння орхідеї самостійно потрібно:

- Обережно здійснити запилення квітки з допомогою гострої палички;
- Через 6 місяців дозрілу коробочку з насінням орхідеї *Phalaenopsis* ізолюють;

- Виділяють насіння з коробочки й проводять його поверхневу стерилізацію;

- Вирощують асептичне насіння *Phalaenopsis* на ЖС в стерильних умовах *in vitro*;

- Через пів року в культурі формуються мікро рослини (рис. 1.7.).

Важливими особливостями при розмноженні орхідеї *Phalaenopsis* є:

- Використання хворої рослини для розмноження. Це характеризуються нездоровим кольором листя, чорними корінням, покритим слизом. Виключенням є розмноження у воді розмноження, який можна застосовувати з хворим або ослабленими рослинами [12];

- Важливо пам'ятати про необхідність стерилізацію зрізів, проведення регулярного поливу. Уникнення попадання на рослини прямих сонячних променів, це шкідливо й несприятливо впливає на процеси росту й розмноження;

Необхідно забезпечити рослину оптимальною температурою, освітленням і вологістю.



Рис. 1.7. Первинні рослини-регенеранти отримані з насінневої культури

Дотримуючись основних вимог, вегетативне розмноження можна здійснити навіть в домашніх умовах [36]. Поширеним при вирощування орхіди є спосіб вегетативного розмноження з використанням цитокінінової пасти, це препарат на основі фітогормону цитокініну та вітаміну, який сприяє стимуляції ділення клітин. Найчастіше використовують цей спосіб наприкінці зими або навесні, складається він з таких етапів.

1) Ватною паличкою змоченою у воді протирають лусочки бруньок, на яких буде застосовувана паста, перевагу надають нижнім або верхнім сплячим брунькам;

2) Обережно, голкою чи гострою дерев'яною паличкою, знімають захисну брунькову луску, в місцях оголення тканин буде видно сплячу бруньку (рис.1.8.).

Це місце й саму бруньку добре покривають цитокініновою пастою;

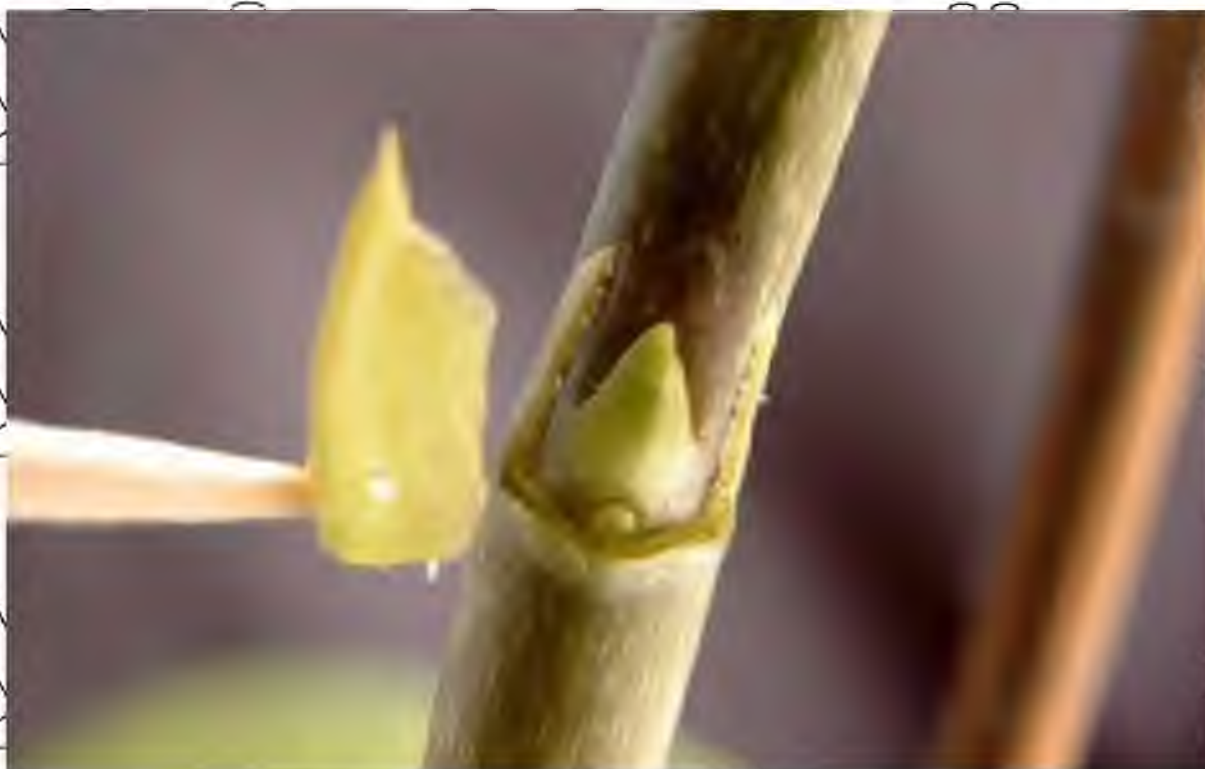


Рис. 1.8. Спляча брунька *Phalaenopsis*

3) Місце нанесення перевіряють, спостерігають за брунькою, щоб вони не пересихали і при необхідності обприскуйте трохи теплою водою. Результат проявляється від одного до двох тижнів;

4) Через 2 тижні з'являються більше двох пагонів з однієї бруньки (рис. 1.9.), які стерильним інструментом відділяють та вирощують окремо від материнської рослини [2, 41].

Наступний вегетативний спосіб розмноження *Phalaenopsis* за допомогою квітконосу (рис. 1.9.).



Рис. 1.9. Утворені мікро рослини зі сплячих бруньок *Phalaenopsis*



Рис. 1.10. Утворені мікро рослини на зрізаних квітконосах *Phalaenopsis*

НУБІП УКРАЇНИ

Може проводитись на зрізаних квітконосах. Цей спосіб подібний з попереднім, адже в ньому також використовують цитокінін'єву пасту, або інший стимулятор росту для сплячих бруньок. Відмінний він тим, що формування окремих міні-рослин відбувається на зрізаних квітконосах довжиною 5-7 см, які знують у посудину з водою на 4-5 см нижньої, зрізаної частини.

НУБІП УКРАЇНИ

Такі зрізані частини квітконосів протягом декількох тижнів витримують у воді, періодично змінюючи на свіжу, та часто змазують цитокініновою пастою сплячі бруньки та місці поранення на квітконосі (рис.1.10.). Проведення таких заходів забезпечує пробудження сплячих бруньок й формування мікро рослин [8, 21].

НУБІП УКРАЇНИ

Ще один поширений спосіб розмноження, що часто використовується аматорами в домашніх умовах, і є досить ефективних за допомогою «дочірніх бруньок», проводиться шляхом стимуляції бруньок на квітконосі, наступним чином:

НУБІП УКРАЇНИ

1) Проводять цей спосіб переважно у лютому місяці, перед цим значно зменшують полив квітки та не вносять підживлення до того часу, поки не прокинуться «дочірні бруньки» (приблизно через місяць такого догляду спляча брунька прокидається);

НУБІП УКРАЇНИ

2) Після того як «дочірні бруньки» прокинулись, рослину переводять в звичайний режим, нормалізують полив, підживлення та світловий режим;

НУБІП УКРАЇНИ

3) Через півроку у пагонів з «дочірніх бруньок» утворюється 2-3 листки і корінці довжиною 2-3 см;

НУБІП УКРАЇНИ

4) Рослини відокремлюю й вирощують у горщику (рис. 1.11.).



Рис. 1.11. Сформовані рослини *Phalaenopsis* в «Дочірніх бруньок»

1.3. Використання в фітодизайні та озелененні

Орхідеї *Phalaenopsis* відомі, перш за все, як красиво квітучі декоративні рослини, і тому є улюбленими орнаментальними квітами.

Ринок орхідей – найбільший серед кімнатних рослин. За останні 20 років декоративні орхідеї родини *Phalaenopsis* Blume, стали найбільш масовими кімнатними рослинами й елементами фітодизайну в світі. Орхідеї вирощують як декоративні рослини і цінують як зрізані квіти не тільки через їх екзотичність краси, але також їх тривалого терміну зберігання [20].

Квіти орхідеї чудово виглядають як у поєднанні з іншими квітами, так і окремо (рис. 1.12). Найчастіше *Phalaenopsis* реалізують як горщикову культуру, але часто використовують і зрізані. Композиції із зрізаних орхідей можуть стояти до 3-4 тижнів. Гарно поєднується з такими квітами як троянда, півоноподібний тюльпан, півонії тощо [29, 67].



Рис. 1.12. Квіткова композиція за участі *Phalaenopsis*

Представники *Phalaenopsis* мають широкий спектр кольорів, буває білий, рожевий, малиновий, темно-фіолетовий, жовтий, теракотовий, зелений тощо, ці кольори часто використовують при оформленні святкових зон, офісному дизайні. *Phalaenopsis* люблять за ніжність кольорів, високу декоративність та стійкість [34].

Часто використовують в кокедамах та тераріумах. Якщо ландшафтний дизайн дозволяє використовувати підвісні системи для розміщення горщиків з квітами, то композиції за участі орхідник виглядають дуже красиво і сучасно.

Останнім часом в світі пробують висаджувати орхідеї на деревах, які підходять для цього, такий дизайн виглядає дуже стильно [40].

Phalaenopsis може квітнути й тримати бутони в елементах декору та композиціях протягом чотирьох місяців, що збільшують попит цих рослин на світовому ринку. Ще одним поширеним елементом декору за участі *Phalaenopsis* є їх використання як основного компоненту фітостін (рис. 1.13). За належного

догляду фітоестіни з *Phalaenopsis* матимуть пишне цвітіння, великі бутони, здоровий вигляд рослин.

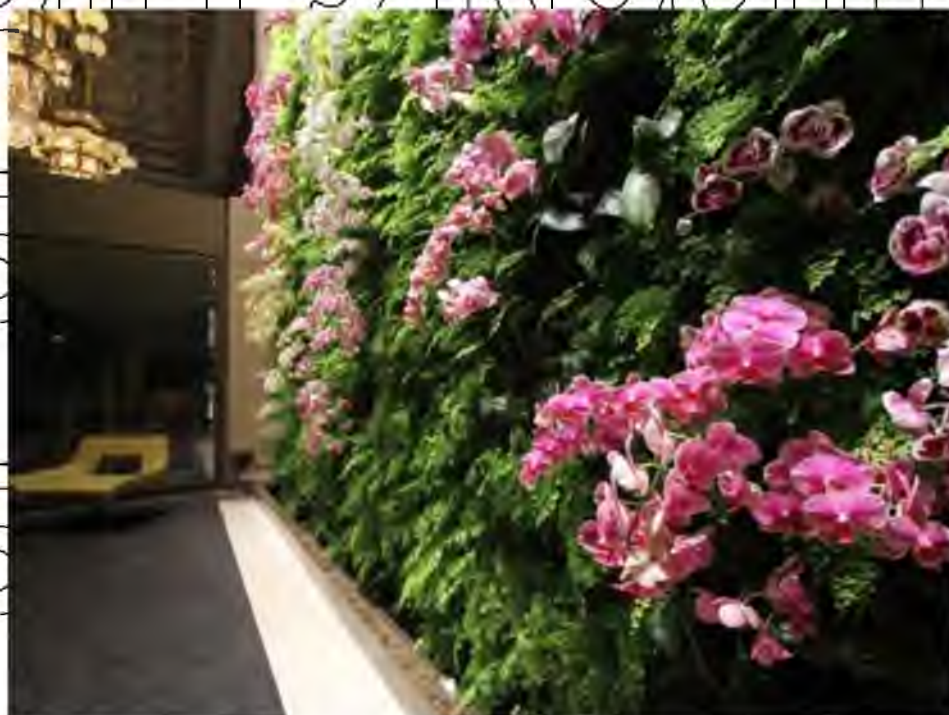


Рис. 1.13. Фітоестіна за участі *Phalaenopsis*

Дуже часто зустрічаються й набули неабиякого попиту орхідеї у флораріумах, це оригінальне оформлення не лише в інтер'єрі, а є гарним подарунком на будь яке свято (рис. 1.14.).



Рис. 1.14. Флораріум за участі *Phalaenopsis*

Такий собі міні-сад у пляшці, чи іншій ємкості, дозволяє створити частинку тропічного лісу у міській квартирі. Комерційні пропозиції флораріумів вражають своїм різновидом та вартістю. Найчастіше для створення флораріумів

використовуючи орхідеї, диффенбахії, бромелії, алоказії та ін. Саме флораріуми за участі орхідних, останнім часом набули неабиякої популярності у флористиці [47, 76].

Незважаючи на широку видову різноманітність орхідей, вони всі мають спільну морфологічну рису, це будову квітки, що має три чашолистки і три пелюстки – одина з яких особливо виділяється розміром і забарвленням, що таке є і декоративною особливістю.

Орхідеї можуть рости скрізь за винятком Антарктиди, однак найбільш вони поширені в тропічних лісах й характеризуються високим показником пристосовності. Як приклад, в Австралії один вид цих рослин живе під землею і запилюється підземними тваринами. Орхідеї не викликають алергії. Хоча всі вони мають запах, однак деякі виділяють екзотичні медові аромати, а інші поширюють запах гниючого м'яса [49].

Східна медицина традиційно використовує орхідеї для приготування ліків від багатьох хвороб. Незважаючи на те, що різні види цієї рослини мають різні лікувальні властивості, їх об'єднує те, що практично всі вони володіють знеболювальною дією. Препарати, отримані з орхідей, використовують для лікування ревматизму, радикуліту, невралгії, гінекологічних, шлунково-кишкових та урологічних захворювань. Їх застосовують як засіб для загоєння ран і виразок, з орхідей роблять протиотрути від укусів змій, готують тонізуючі і збуджуючі напої. З компонентів цих рослин готують лікувальні масла і імуностимулюючі препарати, отримують ліки проти набрякості і для посилення потенції [54].

Лікарські засоби та препарати, отримані з деяких видів орхідей, мають здатність прискорювати зрощення переломів кісток [77]. Чай з квітів орхідей може знижувати артеріальний тиск і занурювати в спокійний сон. Листя орхідей застосовуються для лікування діабету і регуляції імунної системи. А бульби орхідей – застосовують при отруєннях, розладах травлення і слабкості статевої

системи. У народній медицині відвар бульб орхідей зварений на молоці, використовується для лікування туберкульозу [66].

Нижні квіти орхідеї характеризуються тривалим терміном життя, що особливість досі вивчають багато вчених у світі [77]. Багато досліджень приділяють увагу вивченню забарвлення квіток у орхідей та ідентифікації нових унікальних компонентів. Саме тому екстракти і масло орхідеї стали широко застосовуватися в складі багатьох сучасних косметичних засобів. Вони інтенсивно пом'якшують і звожують шкіру, добре знімають подразнення і можуть бути використані для догляду за шкірою будь-якого типу [61].

Нещодавно французькі вчені відкрили, що з кореня орхідеї можна отримувати особливий екстракт, що підвищує еластичність шкіряних покривів [1]. Він не тільки сприяє відновленню клітин, але і активізує формування цитокінінів. Сьогодні препарати, отримані з різних видів орхідей, включають до складу найрізноманітнішої косметики. Серія для делікатного догляду за чутливою шкірою, засоби професійного догляду за зрілою шкірою, косметичні продукти для догляду за волоссям, гелі, дезодоранти та багато інших високоякісних косметичних засобів, вироблених на основі продуктів з орхідей.

Парфумерна не є виключенням. Аромати для косметичних продуктів, ароматичні свічки, ексклюзивні запахи й ароматичні композиції в складі високоякісних парфумерних засобів яких є представники *Phalaenopsis* [4].

1.4. Теоретичні і прикладні основи мікроклонального розмноження

Аналіз літературних джерел показав, що в межах родини *Orchidaceae* Juss. наявний широкий спектр типів життєвих стратегій, зумовлених способом життя, біотичними зв'язками із запилювачами та симбіонтами. Така екологічна спеціалізація не лише обумовила надзвичайне різноманіття видів у межах родини *Orchidaceae* Juss., але й призвела до того, що багато видів перебувають під загрозою зникнення, усі види, які проростають на території України занесені до Червоної книги України. Біотехнологічні методи мікроклональне

розмноження, меристемна культура можуть суттєво збільшити можливості використання високопродуктивних генотипів рослин, а також сприяти збереженню та розмноженню рідкісних видів, їх оздоровленню [56].

Мікроклональне розмноження – це масове безстатеве розмноження рослин в культурі клітин і тканин, при якому отримують рослин генетично-ідентичні вихідному рослинному матеріалу [47].

За даними Батигін Т. Б. і Васильєвої В. Є. культура клітин, тканин та органів рослин – це один з біотехнологічних прийомів, що використовується для масового розмноження ідентичних рослин [35].

Цей метод включає ізоляцію експлантів з пагонової чи листової тканини, перенесення стерильних експлантів на живильне середовище для індукції рослин, їх масове розмноження, укорінення та адаптацію.

Першим, хто почав використовувати мікроклональне розмноження був французький вчений Жорж Морель, який в 1960 році розробляв цей метод для орхідей. Він використовував верхівкові меристеми цимбидума, яка складалася з конуса наростання і двох-трьох листових зачатків, з яких за певних умов формувались сферичні зародкоподібні структури – протокорми.

У 1983 році вчені в області біотехнології рослин Н.В. Катаєва та Р.Г. Бутенко виділили два різних типи мікроклонального розмноження:

1. Активіація вже існуючих в рослині меристем (апекс стебла, пазухи і сплячі бруньки стебла).

2. Індукція виникнення бруньок або ембріодів *de-novo*:

- а) утворення адвентивних пагонів безпосередньо тканинами експлантів;
- б) індукція соматичного ембріогенезу;
- в) диференціація адвентивних бруньок в первинної та пересадковій калюсній тканині [38].

Базуючись на вже сформовані наукові підходи мікроклональне розмноження виділяють такі типи за які миможна проводити маніпуляції тканин та органів в стерильних умовах *in vitro*:

- подолання апікального домінування й розвиток пазушних бруньок;
- мікроживцювання;

НУВБІП УКРАЇНИ

- культура мікробульб, мікроцибулин;
- індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантів;

• отримання калусних тканини з наступною індукцією органогенезу або

ембріологенезу.

НУВБІП УКРАЇНИ

Масове отримання калусу з наступним формуванням мікропагонів, можна було б вважати ідеальним методом великомасштабного розмноження, проте в даний час існує два серйозні недоліки, що обмежують використання цього

підходу. Основне це здатність багатьох рослин-регенерантів, отриманих з

НУВБІП УКРАЇНИ

калусу втрачати здатність до формування нових рослин як в первинній так і пересадковій калусних тканини. У той же час поступово зростає число поліплоїдних, анеуплоїдних та інших генетично змінених клітин, відповідно

рослин, що відрізняються від вихідної батьківської форми [39].

НУВБІП УКРАЇНИ

1.5. Сучасний стан досліджень культури клітин, тканин та органів

За останні десятиріччя ХХ ст. для вивчення проблеми морфогенезу разом із класичними описовими методами (гістохімічними, електронно-мікроскопічними

та ін.) набуває значення експериментальний метод культури клітин, тканин та

НУВБІП УКРАЇНИ

органів рослин. Теоретично, в культурі *in vitro* майже кожен тотипотентну клітину рослинного організму, створивши їм необхідні умови, можна спрямувати на різні шляхи розвитку тканин та органів [35, 39]. Встановлено, що

диференціація тотипотентних клітин популяції *in vitro* залежить від виду та

НУВБІП УКРАЇНИ

генотипу рослини донора, від типу експланта (частини органу) та його властивостей, від умов культивування (різних живильних середовищ, додаткових речовин, екзогенних регуляторів росту рослин, стимуляторів тощо),

від фізичних факторів культивування (фотоперіоду, якості та інтенсивності

освітлення, температурного режиму, рН, вологості повітря) [55].

НУВБІП УКРАЇНИ

Дослідник Vendrame et al. описав, що для отримання стерильного насіння потрібно невелику порцію помістити в стерильний шприц на 5 мл з тканинним фільтром та занурити на 30 секунд у 70% етанол, а потім в 0,75% розчин

гіпохлориту натрію (NaOCl) з концентрацією 1,0% та 0,1% Tween 20

НУБІП УКРАЇНИ
 (поверхнево-активна речовина) на 5 хвилин за постійного помішування. Після цього насіння промивають 5 разів і використовують для висадки в культурі в чашках Петрі [23].

НУБІП УКРАЇНИ
 Найпоширенішими ЖС для культивування орхідних здійснюють на середовищі МС із використанням 100% концентрації макро- та мікроелементів, 3000 мг·л⁻¹ сахарози, 700 мг·л⁻¹ агару, 100 мг·л⁻¹ міоїнозитоли та 1000 мг·л⁻¹ активованого вугілля. Та для отримання різних морфогенних структур використовують МС доповнений ананасовим соком (МС + АС), МС з кокосовою водою (МС + КВ), МС з додаванням 0,5 мг·л⁻¹ індолілоцтової кислоти (ІОК) і МС з 0,5 мг·л⁻¹ гібереллової кислоти (ГК) (МС+ГК). Середовища з органічними добавками готували шляхом додавання 200 мл·л⁻¹ (20%) кокосової води та ананасового соку відповідно з рН 6,0.

НУБІП УКРАЇНИ
 Дослідник Іванніков Р. В. зазначав, що глибока спеціалізація орхідей у деякій мірі компенсується гетерогенністю ювенільної популяції та великою кількістю насіння, яке у досліджуваних видів, як і у всіх *Orchidaceae* Juss, дрібне, й має неправильну форми [22].

НУБІП УКРАЇНИ
 За аналізу морфологічної будови насіння Іванніковим Р. В. не було встановлено суттєвих відмінностей які б чітко свідчили про приналежність до того чи іншого виду, або таких, які б дозволили констатувати різницю в умовах існування та розповсюдження у природі. Проте статеве відтворення представників орхідних в процесі ембріогенезу, проходить достатньо типово для більшості представників і завершується утворенням зародка з органами, подальший розвиток якого відбувається з метаморфозом.

НУБІП УКРАЇНИ
 Автор зазначає, що морфогенез всіх видів орхідних в асептичних умовах відбувається ідентично, відрізняються лише строки диференціації, закладки, росту та розвитку тих чи інших органів, їх форма та колір.

НУБІП УКРАЇНИ
 Аналіз літературних даних з ембріогенезу вищих рослин морфогенезу видів *Laelia Lindl* в умовах культури *in vitro*, та думка ряду вчених з цього питання [3, 6, 8, 35, 39] говорить про те, що апікальна частина зародку в орхідних, може бути прирівняна до апікальної меристеми пагону [3].

Доведено, що вже на перших етапах культивування орхідної із насіння серед загального числа сіянців зустрічається певна частина рослин з морфологічними відхиленнями, що підтверджує складну гетерозиготну природу геному орхідей. Такі сіянці цікаві з селекційної точки зору як нові генотипи.

Деякі автори відмічають різницю в рості, розвитку та формуванні морфогенних структур деяких орхідних особливо на останніх етапах росту в культурі, тому рекомендують додавати до базового ЖС гомогенат банана, що містить такий баланс фітогормонів, який забезпечує нормальний розвиток культур орхідних [69].

Автор Загричук описує, що для мікроклонального розмноження асептичних 1,5-2-місячних рослин, найкраще використовувати ЖС а МС та Гамборга, Евелейт (B5) [61], доповнені різними концентраціями регуляторів росту: 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), індолилцтової кислоти (ІОК) та кінетину (Кін). В свою чергу для індукції калусоутворення краще культивувати кореневі та стеблові експланти на ЖС МС, МС/2, Шенка, Хільдебрандта (ШХ) [6], [62], B₅ та середовище B₃/2 (B₅ з половинним вмістом макро- та мікроелементів), доповнені різними концентраціями 6-бензиламінопурину (БАП) і 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти (2,4-Д). Також автор рекомендує культивувати рослини в темряві при 22-22,5°C, й субкультивувати рослини кожні три тижні.

Відомо, що при культивуванні пагонів відносна вологість повітря в посудині досягає близько 80%. Тому основне завдання адаптації *ex vitro* – це створення відносно високої вологості повітря в перші дні після пересадки рослин-регенерантів, оскільки значні втрати води, погано розвинуті продиhi й недостатня кількість воскоподібних речовин можуть привести до загибелі мікроклонів. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману.

Індійськими вченими запропонований простий метод запобігання швидкого зневоднення листя рослин, вирощених *in vitro*. Під час пересадки клонованих рослин в польові умови, листя протягом усього періоду акліматизації обприскують 50%-ним водним розчином гліцерину або сумішшю парафіну і диметилового ефіру (1:1). Застосування такого підходу допомагає уникнути

довготривалих процесів адаптації пробіркових рослин й забезпечує біля 100% приживлюваності.

Через 20 - 30 днів після висадки в умови відкритого чи закритого ґрунту, добре вкорінені рослини підживлюють розчином макро- й мікросолей Кнудсон, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (в залежності від виду рослин використовують базову або зменшену вдвічі концентрацію) або комплексним мінеральним добривом. По міру зростання клонових рослин їх пересаджують у великі ємкості зі свіжим субстратом. Подальше вирощування адаптованих рослин відповідає прийнятій агротехніці вирощування даного виду.

Відомо, що при культивуванні пагонів відносна вологість повітря в посудині досягає близько 80%. Тому основне завдання адаптації *ex vitro* – це створення відносно високої вологості повітря в перші дні після пересадки рослин-регенерантів, оскільки значні втрати води, погано розвинуті продихи й недостатня кількість воскоподібних речовин можуть привести до загибелі мікроклонів. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману.

Індійськими вченими запропонований простий метод запобігання швидкого зневоднення листя рослин, вирощених *in vitro*. Під час пересадки клонованих рослин в польові умови, листя протягом усього періоду акліматизації обприскують 50%-ним водним розчином гліцерину або сумішшю парафіну і диметилового ефіру (1:1). Застосування такого підходу допомагає уникнути довготривалих процесів адаптації пробіркових рослин й забезпечує біля 100% приживлюваності.

Через 20 - 30 днів після висадки в умови відкритого чи закритого ґрунту, добре вкорінені рослини підживлюють розчином макро- й мікросолей Кнудсон, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (в залежності від виду рослин використовують базову або зменшену вдвічі концентрацію) або комплексним мінеральним добривом. По міру зростання клонових рослин їх пересаджують у великі ємкості зі свіжим субстратом. Подальше вирощування адаптованих рослин відповідає прийнятій агротехніці вирощування даного виду.

НУБІП України

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження

Як об'єкт досліджень для введення в культуру *in vitro* були використані рослини *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. З рослин відокремили культуру сухих й незрілих стрючків та вегетативні частини квітконосу з сплячими бруньками (рис. 2.1.).



Рис. 2.1. Рослини *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume
Дослідження з мікроклонального розмноження рослин *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume проведені на базі науково-дослідної лабораторії біотехнології рослин ВП НУБІП України «Боярська лісова дослідна станція» упродовж 2021 р. й на базі науково-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБІП України у 2019-2021 рр.

2.2. Вибір та стерилізація експлантів *Phalaenopsis amabilis* Blume

Спосіб вибору експлантів та отримання асептичної культури *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume включав сезонний вибір експлантів від рослини-донора із використанням фрагментів квітконосу та отримання асептичної культури з насінневого стручка. Стручки збирають, коли вони дозрівають або лопаються. Це означає, що пилкова трубка пилку досягла яйцеклітин і запліднила її. Враховуючи цей фактор, ми маємо можливість вибрати техніку, за допомогою якої будемо висіватись насіння орхідеї. Існує два способи збору й посіву насіння орхідеї. Це культура сухих стручків і культура зелених стручків. Культуру сухих стручків також називають насінневою культурою, оскільки експлант, який потрібно використовувати – це зріле життєздатне насіння. За цього методу коробочка орхідеї вже лопнула, і насіння готове до переносу або висіву.

Зазвичай для дозрівання коробочки орхідеї потрібно багато часу (4-10 місяців), і як правило, коли вона розкривається, частина насіння вже втрачається. Тому дуже важливо регулярно перевіряти стручки орхідей на ознаки зрілості (пожовтіння та наявність тріщин). Після того, як стручки готові, їх відрізають від квітконосу, загортають у суху серветку і доставляють до лабораторії. Насіння в коробочці необхідно належним чином висушити в ексикаторі. Ексикатор зазвичай складається з великої пляшки з кришкою та з металевою сіткою на дні. Під металевим екраном є кишені для осушувача, які можна придбати в аптеках. Осушувач складається з хімічних солей (силікагель або хлорид кальцію), які поглинають вологу з повітря всередині пляшки. Після висихання насіння можна також деякий час зберігати в холодильнику або відразу ж висівати в колби.

У культурі зелених стручків, яку також називають культурою ембріонів, незріле насіння використовується як експлант. У орхідей інтервал від запліднення до запліднення різний залежно від роду, коливається в межах від 10 днів до 6 місяців. Дослідження показали, що ембріони орхідей стають життєздатними і здатні прорости незабаром після запліднення. Це відбувається задовго до

дозрівання насіння. Культура зелених стручків дає перевагу скорочення часу від запліднення до розмноження в пробірці.

Техніка культури зелених стручків:

1. Зрілий стручок орхідеї промивають миючим засобом і проточною водою. Перевіряють стручок на наявність пошкоджень або зараження;

2. У ламінарному боксі стручок, скальпелі і пінцети стерилізують, занурюючи в 95 % етиловий спирт і фламбують (обпалюють) принаймні 3 рази над спиртовою лампою;

3. У стерильну чашку Петрі поміщають стручок і розрізають вздовж (залежно від розміру стручка);

4. Незріле насіння (білого, жовтого або світло-жовто кольору) обережно переносять на ЖС для проростання;

5. Чашки петрі, або колби маркують й переносять на освітлені полиці в культуральну кімнату. Через тиждень контаміновані культури видаляють і стерилізують (деконтамінують) за процедурою, подібною до стерилізації, що використовують для вегетативних частин пагонів;

6. Через 3-4 тижні життєздатні експланти незрілих зародків проявляють ознаками проростання (збільшення яйцеклітин і позеленіння). Через 2 місяці або коли протокорми досягають 1 см завдовжки, культури готові до пересадки.

За використання культури сухих стручків, брали висушене насіння орхідеї (стручок вже відкриті). Цей процес, як правило, має негативний вплив для насіння й проростання після маніпуляцій має низький коефіцієнт. Виконується наступним чином:

1. Стручок переносять на чистий аркуш білого паперу й витрушують насіння наверх всередині коробочки;

2. Насіння переносять у пробірку із кришкою й додають всередину цукровий розчин та розчин детергенту з 1-2 краплі Tween 40, закривають кришкою і струшують до тих пір, поки насіння не буде занурене або повністю вологе. Залишають насіння в розчині на 16–24 годин;

3. Через 24 години наливний розчин зливають й наливають у пробірку 10% розчин хлороксу плюс 1-2 краплі Tween 80 або розчин перексиду водню 18,5%. Закривають кришкою пробірку і енергійно помішують і залишають на 40 хв;

4. Після цього за допомогою центрифуги насіння осаджують й промивають 3 рази стерильною дистильованою водою;

5. Під час останнього промивання залишають трохи стерильної дистильованої води у пробірці й виливають суміш насіння і води в середовище для пророщування. На кожну чашку петрі чи колбу достатньо однієї краплі розчину з насінням;

7. Далі пробірки переносять у термальну кімнату;

8. Контаміновані культури видаляють, насіння, що проросло використовують для пересадки.

В наших дослідженнях незріле насіння в коробочках *Phalaenopsis* Blume (рис. 2.2.) використовували для посіву на ЖС МС [70] та Кнудсона [30] з додаванням активованого вугілля 1 г/л, гумату натрію і мікроелементами [31]. Стерилізацію та ізоляцію незрілого насіння проводили за технікою культури незрілих стручків, описану вище.



Рис. 2.2. Насіння із стручка *Phalaenopsis* Blume

Насіння мало біле з жовтуватим відтінком забарвлення, було дрібне за розміром та злегка злипалося одне з одним. Усі роботи із стерилізації, ізоляції та висіву насіння в ламінарному бокеі.

За використання культури сухих стрючків коробочки прожарювали у полум'ї спиртівки та стерилізували протягом 10 хвилин в 20% розчині пероксиду водню, з триразовим промиванням в стерильній дистильованій воді. Стерильними інструментами насіння рівномірно розподіляли по поверхні ЖС. Культивування насіння проводили в термальній кімнаті при температурі 22-24°C, освітленні 24 тис. лк.

Стерилізацію експлантів (частини квітконосів) проводили різними способами:

1 – стерилізували протягом 10 хвилин в 20% розчині пероксиду водню, з триразовим відмиванням;

2 – стерилізували спочатку етиловим спирт 70% протягом 1 хв, далі 0,1% AgNO_3 (нітрат срібла) – 3-4 хв, споліскували в стерильній дистильованій воді – 2 рази по по 3-5 хв.

Живильне середовище (ЖС) було використано на основі пропису ЖС Мурасіге і Скуга з додаванням кінетину (КІН) і активованого вугілля. Як джерело вуглецю використовувалася сахароза в концентрації 30 г/л. Для отримання напівтвердого живильного середовища застосовували агар-агар для мікробіологічних цілей та культури *in vitro* в концентрації 7 г/л.

2.3. Етапи і методи мікроклонального розмноження

Процес мікроклонального розмноження можна розділити на 4 етапи:

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання добре зростаючої стерильною культури;

2. Власне мікроклональне розмноження, коли досягається отримання максимальної кількості клонів з меристемних тканин;

3. Укорінення розмножених пагонів з наступною адаптацією їх до ґрунтових умов, й за необхідності депопування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+ 2°C, + 10°C);

4. Вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до реалізації або висадки на об'єкти, розсадники тощо.

Необхідно зазначити, що хімічний склад живильного середовища, та його фізичні властивості повинні відповідати тим завданням, які виконує середовище на кожному етапі мікроклонального розмноження.

Використання у складі ЖС активованого вугілля має успішний вплив на формування й ріст пагонів. Активоване вугілля адсорбує токсичні речовини, вторинні метаболіти, виділяють експланти. Необхідно врахувати той факт, що одночасно з адсорбцією екскудантів вторинної природи, активоване вугілля здатне суттєво зменшувати концентрацію біологічно активних речовин гормональної природи [24].

Виділяють основні фактори, що впливають на ефективність мікроклонального розмноження:

- Генетичні і фізіологічні чинники.
- Гормональні фактори.

- Фізичні фактори.

- Технічні труднощі мікроклонального розмноження й адаптації клонованих рослин.

Під час адаптації для більшості рослин-регенерантів у якості субстратів використовують суміші: торф, пісок, дернова земля, перліт у різних співвідношеннях [32].

Контейнери, касети для адаптації, ящики або торф'яні горщики, в яких вирощують рослини-регенеранти, заповнюють заздалегідь приготованим ґрунтовим субстратом.

2.3.1. Способи стерилізації в культурі тканин та органів. Роботи з культурою клітин і тканин *in vitro* проводять у стерильних (асептичних) умовах у боксі мікробіологічного типу або ламінар-боксі, стерильними інструментами,

у стерильному посуді, на стерильних живильних середовищах. У випадку порушення стерильності на середовищах добре розвиваються мікроорганізми (гриби, бактерії), що порушують його склад й пригнічують ріст рослинних експлантатів. Тому для їх знешкодження використовують наступні методи стерилізації:

- вологим паром (автоклавуванням);
- сухим жаром (нагріванням за допомогою гарячого повітря у спеціальних шафах при температурі +120 – 250 °С);

- хімічними речовинами;

- фільтруванням;
- опроміненням ультрафіолетовими променями;
- полум'ям.

Стерилізації приміщень (боксів, культуральних кімнат) здійснюють за загальноприйнятими септичними методами. Підлогу кімнати миють водою з мийним засобом. Найчастіше для стерилізації приміщень використовують бактерицидні аргонно-ртурні, ртутно-кварцеві або ультрафіолетові лампи опромінювання. Для стерилізації операційної кімнати площею 9–12 м² і висотою до 3 м можна використовувати лампу типу ПРК-7, потужність 1000 Вт

(табл. 2.1.)

Таблиця 2.1

Кількість ультрафіолетових ламп, які необхідні для отримання

максимального ефекта стерилізації в приміщеннях різного розміру [65]

Ширина приміщення (в м) при висоті 3 м	Довжина приміщення							
	2,5–3,3		3,5–4,5		4,9–6,0		6,0–8,0	
	15 Вт	30 Вт	15 Вт	30 Вт	15 Вт	30 Вт	15 Вт	30 Вт
2,5–3,3	2	1	2	1	2	1	3	1
3,5–4,5			3	1	3	1	4	2
4,9–6,0					4	2	5	2
6,0–8,0							6	2

Внаслідок шкідливої дії на організм людини ультрафіолетового опромінення і озона, стерилізацію опроміненням проводять напередодні роботи

протягом 1,5–2 год. Для знешкодження пилу та спор мікроорганізмів приміщення періодично оброблюють водяним паром або застосовують етиленглікольвмісні препарати у вигляді емульсій.

Усі поверхні ламінар-боксу ретельно відмивають миючими засобами, водою й розчинами хлорвмісних речовин. Бокс стерилізують бактерицидними лампами типу ОБП – 300, БУФ – 15, БУФ – 30 або альтернативних іноземних марок. Після цього поверхні боксу обробляють 95 % етиловим спиртом.

Інструменти стерилізують у сушильній шафі протягом 2–3 год при $T=160-180$ °С. Металеві інструменти автоклавувати не можна, оскільки під дією пари утворюється іржа. У ламінар-боксі попередньо перед роботою і під час роботи інструменти ще раз стерилізують, поміщаючи у фарфорову склянку із 95 %-им етиловим спиртом з наступним фламбуванням у полум'ї пальника.

Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції.

Перед стерилізацією посуд мють лужним (для посуду, який був у використанні) або кислотним способом (для нового посуду). Найпоширенішим і надійним способом очистки скляного посуду є його обробка концентрованою сірчаною кислотою з біхроматом калію протягом 4–6 год.

Потім посуд промивають проточною водою і споліскують 3 рази дистильованою. Після висушування його прожарюють у сушильній шафі при $T=160-180$ °С протягом 2–2,5 год або автоклавують. Стерильний посуд закривають ватними або целофановими ковпачками і зберігають у закритих шафах. Стерилізацію рук проводять 95 % етиловим спиртом, попередньо вимивши їх з милом.

Стерилізацію живильних середовищ здійснюють двома методами: автоклавуванням та пропусканням через стерильний бактеріальний фільтр.

Посуд, халати, вату, папір, дистильовану воду стерилізують в автоклавах під тиском пари 1–2 атмосфери й температурою 120–133 °С відповідно 15–60 хв (залежно від об'єму стерилізуючого матеріалу). Колби, штативи із середовищем, вату, папір, халати перед автоклавуванням загоргають у папір або поміщають у бокси [19, 72].

2.3.2. Отримання асептичної культури рослин. Поверхні органів рослин інфіковані спорами різних мікроорганізмів. Проте внутрішні тканини вважаються стерильними, хоч і в них можуть знаходитись непатогенні бактерії.

Вимоги до стерилізуючих речовин: правильний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона вбивала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила рослинним тканинам. Труднощі полягають у стерилізації об'єктів з тріщинами, заглибинами, пошкодженнями (насіння, плоди, стебла листяних та хвойних порід дерев). У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, але і проникання всередину стерилізуючого розчину може в подальшому негативно впливати на ріст тканини в умовах *in vitro*. Тому стерилізуючий розчин повинен легко вимиватись з тканини дистильованою водою або розкладатись, щоб не отруювати тканину.

Для ефективної стерилізації користуються уже відомою технікою стерилізації даного об'єкту або ж розробляють її експериментально для кожного конкретного випадку, оскільки один і той же орган у різних рослин вимагає різних умов стерилізації. Вид стерилізуючих речовин, концентрація та тривалість дії залежать від щільності та чутливості тканини, яку стерилізують.

При правильному доборі стерилізуючої речовини інфікування тканин не перевищує 1–3%.

Рослинні об'єкти перед стерилізацією ретельно промивають у воді з миючими засобами (іноді з бактерицидним милом), очищають від зайвих тканин.

З коренів і коренеплодів знімають шкірку, з пагонів – кору, із бруньок – покривні луски. Після цього рослинний матеріал відмивають у проточній воді та споліскують у дистильованій. З метою покращення змочування опушених поверхонь до стерилізуючих розчинів додають детергенти – поверхнево активні речовини, миючі засоби (мило, порошок, тощо) 4–5 крапель на 1 л води.

Рослинний матеріал стерилізують наступними розчинами речовин:

- хлор вмісними (хлорамін, гіпохлорид Ca і Na, хлорне вапно);
- бром вмісним (бромна вода);
- ртуть вмісними (0,1% - сулема, діанід, фамосепт);
- окисниками (пероксид водню, перманганат калію);

НУБІП УКРАЇНИ

- етиловим спиртом;
- нітратом срібла;
- антибіотиками;
- фенолом;

- концентрованою сірчаною кислотою.

НУБІП УКРАЇНИ

Гіпохлорид натрію $[\text{NaClO}]$ - використовують для обробки будь-яких експлантатів у вигляді 0,5–5 % розчину протягом 1–20 хв. Ця речовина є клітинною отрутою, тому час стерилізації необхідно звести до мінімуму.

Наприклад: для ізольованих зародків використовують 2–3 % розчин протягом 10–15 хв, а для насіння 3–5 % розчин протягом 1 год.

НУБІП УКРАЇНИ

Гіпохлорид кальцію $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ - менш токсичний для тканин, ніж NaClO , тому широко використовується. У концентрації 90 г/л застосовують для стерилізації бульбо – і коренеплодів (20–25 хв), пагонів деревних культур (15–30 хв) та стебел трав'янистих рослин (10–15 хв).

НУБІП УКРАЇНИ

Хлорне вапно - рекомендують для стерилізації рослинних об'єктів, складається із чистого $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (містить 70 % активного хлору), використовують в концентрації 50–90 г/л протягом 5–30 хв.

Хлорамін - застосовують у концентрації 1–6%. Пиляки й молоді зародки обробляють протягом 1–3 хв, насіння – 30–60 хв.

НУБІП УКРАЇНИ

Примітка! Розчини з активним хлором використовують 1 раз і готують їх безпосередньо перед роботою. Після стерилізації у вище зазначених розчинах тканини промивають 3 рази стерильною дистильованою водою впродовж 10 хв.

НУБІП УКРАЇНИ

Бром $[\text{Br}]$ - у вигляді 1 % водного розчину протягом 5 хв використовується для стерилізації сухого насіння.

Сулема (двохлориста ртуть) $[\text{HgCl}_2]$ - токсична речовина й вимагає особливої ретельності як при зберіганні, так і при доборі концентрації для окремих об'єктів. Для стерилізації зародків використовують 0,1 % розчин протягом 1–3 хв, корене- і бульбоплодів, насіння, пагонів деревних рослин – до 10–20 хв; листків, стебел трав'янистих рослин – 4–8 хв.

НУБІП УКРАЇНИ

Діацид - використовують в 0,1 % розчині для стерилізації коренеплодів, насіння, верхіткових меристем, ізольованих зародків, пиляків. Діацид готують,

розчиняючи окремо 333,5 мг етанолмеркурхлориду й 666,5 мг М-ацетилпиридинхлориду в гарячій воді (330 мл), потім їх змішують і доводять об'єм рідини до 1 л, додають трохи крапель детергенту Твін-80; зберігають у щільно закритій колбі в темряві.

Добрі результати для отримання асептичної культури дає рідкий ртутний препарат фамосепт, розведений 1:9 при експозиції 10–20 хв.

Примітка! Розчини, що містять ртуть, можна використовувати 3–4 рази. Після стерилізації у вище зазначених розчинах тканини промивають 4–5 рази в стерильній дистильованій воді впродовж 10–15 хв.

Пероксид водню [H_2O_2] – використовують у концентрації 10–30 % протягом 6–20 хв H_2O_2 , менше всього пошкоджує рослинні тканини, швидко розкладається, немає необхідності довготривалої відмивки.

Етиловий спирт - часто застосовують для попередньої стерилізації, протираючи ним поверхню матеріалу або занурюючи матеріал на кілька секунд в абсолютний спирт (плоди, насіння) або використовують 70 % (пагони, листки, зав'язь). Обробка тканин спиртом руйнує восковий шар на листках, посилює дію стерилізуючих речовин.

2.3.3. Технологія приготування маточних розчинів й живильних середовищ. Для штучних живильних середовищ заздалегідь готують розчини макро- і мікросолей, які використовують багаторазово. Це маточні (концентровані) розчини. Їх зберігають за таких умов: макро- і мікросолі, Фелат, цитокініни в холодильнику в посуді із темного скла з притертими пробками за $T = 0...+4$ °С не більше місяця; вітаміни, ауксини, ферменти, рослинні екстракти – за $T = -20$ °С у невеликих посудинах по 5–15 мл (пенцилінові флакони) з пробками не більше двох тижнів.

Маточні розчини макросолей готують в концентраціях, які в 10–40 разів перевищують робочу концентрацію, мікросолей - в 100–1000 разів, вітамінів – в 1000 разів.

Для готування маточного розчину макро- і мікросолей кожену сіль розчиняють в окремій склянці, потім зливають і доводять до потрібного обсягу.

В суміші мікросолей останнім додають розчин солей молібдену, а в макросолі – розчин солей магнію (для запобігання випадання осаду) [14].

Маточні розчини хлористого кальцію й хелата заліза (сірчанокисле залізо + ЕДТА, або Na_2EDTA - трилон Б) готують і зберігають окремо від інших солей.

Концентровані розчини вітамінів готують у такий спосіб: 10-кратні наважки розчиняють в 10 мл дистильованої води кожний окремо. Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК та їх аналогів (наприклад, концентрацію 1 мг/мл) готують, розчинивши 100 мг речовини в 0,5–2 мл спирту, підігрівши та додавши дистильованої води до 100 мл. Кінетин, зеатин, БАП розчиняють попередньо у

невеликій кількості 0,5 н HCl і при нагріванні додають потрібну кількість дистильованої води або розчиняють у 1н NaOH .

Якщо у середовище необхідно внести азецізову кислоту, то її розчиняють в 70% етиловому спирті і доводять до потрібного об'єму дистильованою водою.

Гіберелову кислоту розчиняють безпосередньо у дистильованій воді і додають у живильні середовища, простерилізувавши через мембранні фільтри. Кокосове молоко додають у живильні середовища, попередньо підігрівши його протягом 30 хвилин при $+60\text{ }^\circ\text{C}$ і простерилізувавши фільтруванням (діаметр мембранного фільтра 0,2–0,45 мкм).

Антибіотики, гербіциди та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, додають до живильних середовищ ($T=+40\text{ }^\circ\text{C}$ – $+50\text{ }^\circ\text{C}$) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6–5,8 [48].

Приготування маточних розчинів макро- і мікросолей, Fe-хелату та вітамінів за прописом живильного середовища МС наведені в (табл. 2.2, 2.3, 2.4, 2.5.).

У маточному розчині макросолей, концентрація збільшена у 10 разів. На 1 л середовища відбирається 100 мл маточного розчину. На відмінну від цього маточний розчин мікросолей, де їх концентрація збільшена у 1000 разів (на 1 л середовища відбирається 1 мл маточного розчину). Розчини хелату заліза має містити на 1 л середовища – 5 мл маточного розчину.

Таблиця 2.2

Складові для приготування маточного розчину Макроолей

Складові компоненти	Концентрація, г/500 мл
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,85
$CaCl_2 \times 2H_2O$	2,20
KNO_3	9,50
NH_4NO_3	8,25
NaH_2PO_4	0,85

Таблиця 2.3

Складові для приготування маточного розчину Мікроолей

Складові компоненти	Концентрація, г/100 мл
H_3BO_3	0,620
$MnSO_4 \times 4H_2O$	2,230
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,860
KI	0,083
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,025
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,0025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,0025

Таблиця 2.4

Складові для приготування розчину Fe-хелату

Складові компоненти	Концентрація, г/200 мл
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	1,492
$FeSO_4 \times 7H_2O$	1,112

Вихідний розчин Fe-хелату готують, розчиняючи окремо $Na_2EDTA \times 2H_2O$ і $FeSO_4 \times 7H_2O$; після чого обидва розчини зливають, доводять до потрібного об'єму і кипіння.

Таблиця 2.5

Складові для приготування розчину маточний розчин вітамінів, де їх концентрація збільшена у 1000 разів

Складові компоненти	Концентрація, мг/100 мл
B_1 (тіамін HCl)	10
B_6 (піридоксин HCl)	50
PP (нікотинова кислота)	50

Маточні розчини регуляторів росту концентрацією 1 мг/1мл готують наступним чином (на прикладі НОК і кінетину):

1. Зважити по 15 мг НОК і кінетину;
2. Наважку НОК розчинити у краплі етилового спирту, підігріти;
3. Наважку кінетину розчинити у 1 мл 1н NaOH;
4. Довести об'єм дистильованою водою до 15 мл.

Живильне середовище складається з неорганічних макро- та мікроелементів, органічних домішок (амінокислоти, вітаміни), регуляторів росту, джерела вуглецю та енергії (сахароза, глюкоза, фруктоза), агару та дистильованої води.

Нині розроблено більше 2 тис. варіантів живильних середовищ. Для ізолюваної культури *in vitro* деревних видів використовують наступні живильні середовища: Мурасіге–Скуга – MS (MS) [33, 39], МакКоуна – WPM [33, 39], Сміта і МакКоуна [33, 39], Халупи [35], Шенка, Хільдебранта – SH [33, 39], Андерсона [33, 39], Борнмана – MSM [33, 39], Драйвера – DKW [33, 39], Куаріна і Лепуавра [39], Літвея [39], Міллера [39] та інші. Живильне середовище за прописом MS – універсальне, основа для створення інших середовищ [5, 8, 16].

Живильне середовище – основний фактор успішного культивування ізолюваних рослинних клітин, тканин та органів *in vitro*. У культурі *in vitro* за живильні середовища поділяють на рідкі та агаризовані (тверді); за складом на природні (картопляний, м'ясний та трав'яний відвар), штучні (до природних речовин додають різні органічні та хімічні домішки), синтетичні (складаються з хімічно чистих речовин). Рідкі середовища використовують для культивування суспензій, калосів та рослин-регенерантів. Для підтримки експлантів у пробірці із середовищем поміщають спеціальні містки-підтримки з фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів. Детальніше склад найуживаніших живильних середовищ наведено в (табл. 2.6).

Перелік мінеральних компонентів найбільш вживаних живильних середовищ для культивування *in vitro* деревних видів рослин, мг/л

Компоненти	MS	WPM	Кнудсона
Макроелементи			
NH_4NO_3	1650,0	400,0	400,0
KNO_3	1900,0	-	-
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	96,0	96,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	370,4	250
KH_2PO_4	170,0	170,0	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	500
$(\text{CaNO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	-	386,0	1000
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-
K_2SO_4	-	990,0	990,0
Мікроелементи			
KI	0,83	-	-
H_3BO_3	6,2	6,20	6,20
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	29,4	57,
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25	0,25
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	-
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,30
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	25,0

Фізичний стан середовища. Агаризовані середовища готують на основі агару – поліцукриду, який входить до складу морських водоростей роду *Gracilaria*, що утворює із водою гель при pH 5,6–6,0. Його вносять у середовище у концентрації 6–8 г/л, $t_{\text{плавлення}} \approx 100 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{загусання}} 40\text{--}45 \text{ }^\circ\text{C}$. Іноді як ущільнювач і заміник агару використовують 5% крохмаль, агарозу, Фітогель, Гелріт (гетерополіцукрид, який продукує бактерія *Pseudomonas elodea*, вільний від органічних забруднювачів, які можуть бути в агарі). Гелріт у концентраціях 1,5–2 г/л утворює прозорий гель. Желатин непридатний для культури *in vitro* рослин, оскільки токсичний [63].

pH середовища. Відомо, що в нативних умовах рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації водневих іонів. Відносна стабільність величини pH всередині клітини та середовищі, яке її оточує,

підтримують буферними системами, в яких важливу роль відіграють білкові молекули як амфоліти. Найбільш чутливі до величини рН НОК, ГК та вітаміни. Відносно стабільне значення рН у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або буферних сумішей (фосфати і карбонат кальцію).

Більшість стаціонарних культур ізольованих тканин росте на середовищах з рН 5,6 – 5,8. При низьких величинах рН агар не твердне [53].

Джерело енергії. В умовах *in vitro* живлення рослин гетеротрофне (зміна анатомічної структури, немає постійного доступу CO₂). Для біологічних макромолекул, а також при культивуванні гетеротрофних тканин (калюсів і

суспензій) у живильні середовища слід додавати вуглеводи в концентрації 20–60 г/л. Звичайно це дисахариди (сахароза), моносахариди (гексози: глюкоза й фруктоза, пентози: ксилітоза й інші). Полісахариди, як правило, в живильних

середовищах не використовують. Проте деякі типи тканин (пухлинні), що містять гідролітичні ферменти, вирощують на середовищах із крохмалем, рафінозою і т.д. Сорбіт і манітол вносять у середовище для підтримки осмотичного тиску [63].

Тканини *in vitro* деревних рослин під час культивування виділяють у середовище велику кількість фенольних сполук. Це вторинні метаболіти рослин, основними структурними компонентами яких є ароматичне кільце з однією або декількома гідроксильними групами. Фенольні сполуки захищають рослини від абіотичних і біотичних стресів. Внаслідок їх виділення середовище набуває сіро-чорного забарвлення, а морфогенетична активність тканин пригнічується.

Для усунення цього процесу у живильне середовище додають активоване вугілля (1-5 г/л), вітамін С, цистеїн, глутатіон, полівініліпіролідон, хлорогенцінол та ін. [57].

Враховуючи вищезазначені біотехнологічні методи приготування маточних розчинів макро – та мікросолей для *Phalanopsis Blume* проводять за

такої послідовності (табл. 2.7). Складові компоненти мінеральних середовищ зважують і розчиняють окремо кожну наважку в новій порції дистильованої води. Після приготування розчинів змішують всі макросолі і доводять об'єм

дистильованою водою до необхідного об'єму; за таким же принципом змішують всі мікросолі та доводять об'єм дистильованою водою до необхідного об'єму.

Таблиця 2.7

Для приготування 1 л середовища Мурасиге і Скуга (МС)

Основні складові компоненти	Кількість з розрахунку на 1000 мкл
Макро МС	100 мкл
Мікро МС	1000 мкл
Вітаміни МС	1000 мкл
Fe-хелат	5000 мкл
Інозитол	0,1 г
Сахароза	30,0 г
Активоване вугілля	2,0 г
Агар	7,0 г
Кінетин	250 мкл

1. Для приготування 1 л середовища МС колбу або стакан (1 л) помістити на магнітний змішувач, налити 250-300 мл бідистилляту і додати точно відмірену кількість розчинів макро- і мікросолей, вітамінів МС, Fe-хелат, кінетин;
2. Зважити потрібну кількість інозиту, сахарози. Кожну наважку розчинити у окремій порції бідистильованої води;
3. Довести рН до 5,6-5,8 за допомогою 1N KOH або 1N HCl;
4. Розчину довести до 1 л дистильованою водою. Розчин і воду підігріти;
5. Додоється до розчину активоване вугілля, агар і підігрівається до повного розчинення компонентів;
6. Розлити тепле середовище у колби або пробірки і закрити ватними пробками або фольгою. У колби наливаємо середовище до 1/2-1/3 об'єму;
7. Простерилізувати середовище в автоклаві при тиску 0,8-1,0 атм (температура 115-1200 С) 20-25 хв залежно від об'єму.

Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві варто повільно зменшувати тиск в апараті і відкривати кришку тільки після того, як внутрішній тиск буде дорівнювати зовнішньому (на манометрі стрілка буде на 0). Інакше, через різку зміну тиску може статися змочування пробок і навіть їх виштовхування.

2.3.4. Підбір умов культивування для масового мікроклонального розмноження. Найбільш важливими фізичними факторами, що впливають на процес культивування рослинного матеріалу в умовах *in vitro*, є температура, аерація, освітлення, вологість та осмотичний тиск живильного середовища.

Температура є чинником, що впливає всі процеси первинного, і навіть вторинного метаболізму рослин. Оптимальний режим температури підбирається для кожного виду рослини індивідуально, виходячи з його особливостей та поставленої мети дослідження. Зазвичай використовується температура 25-26°C, яка вважається оптимальною для більшості культур. Щоб активізувати процес морфогенезу, температуру знижують до 18-20°C. У літературі описані випадки для низки культур, коли зниження температури призводить до підвищення ефективності розмноження. Одним із прикладів, що підтверджують такий вплив, є культивування рослин альпійських лук при оптимальному температурному режимі в районі 19°C, тоді як для тропічних рослин оптимумом буде температура порядку 27°C.

Ще одним важливим абіотичним фактором є аерація, яка серйозно впливає на процес культивування рослин. Необхідною умовою для успішного вирощування клітин у ферментерах великих обсягів є постійний доступ до клітин повітря. Якщо ж вирощування відбувається у колбах, тобто у маленьких обсягах, потрібна аерація досягається шляхом нормального регулярного перемішування суспензії. Слід зазначити, той факт, що суспензійні культури не можуть культивуватися без аерації, що є однією з їх особливостей.

Наступним важливим фактором для культивування клітин в умовах *in vitro* є освітлення. Оптимальним освітленням більшості видів рослин є межа від 1000 до 3000 люкс. В умовах повної темряви, або слабого освітлення, ростуть майже всі калусні тканини. Висвітлення також впливає на процес морфогенезу. Затримка розвитку рослин може викликатись за рахунок занадто високої інтенсивності освітлення. На додаток до цього, важливу роль у культивуванні відіграє поєднання гормонального вмісту живильного середовища та спектрального складу світла.

Оптимальна вологість у процесі мікроклонального розмноження має бути від 60 до 70%. Сухе повітря згубно впливає на живильне середовище. Щоб підвищити вологість у кімнатних приміщеннях зазвичай використовують піддони з водою.

Осмотичний тиск живильного середовища також впливає фізичним чинником. Враховуючи індивідуальні особливості фізіології кожного виду культивованих рослин необхідний індивідуальний підбір концентрації осмотичного тиску. При високому осмотичному тиску живильного середовища відбувається утруднення засвоєння в ній необхідних поживних речовин.

При розробці технології введення в культуру будь-якого нового виду рослин необхідно повністю вивчати комплексний вплив усіх фізичних факторів на процеси розвитку та зростання того чи іншого виду рослини [19, 46, 47].

2.3.5. Укорінення та адаптація садивного матеріалу *in vitro* до умов

ex vitro. Поряд з підбором необхідних культуральних середовищ і експлантів для вирощування представників роду *Phalaenopsis* Blume *in vitro*, для подальшого ефективного культивування важливе значення має створення оптимальних умов середовища після перенесення в умови *in vivo*.

Культивування *in vitro* характеризується максимальною стерильністю середовища і вихідного рослинного матеріалу. На етапі перенесення в нестерильні умови втрати рослин становлять понад 50%. Перенесення орхідей з ізолюваних умов *in vitro* в *ex vitro* супроводжується для них стресом. При культивуванні орхідей в *in vitro* їх розвиток відбувається за рахунок елементів живильного середовища за допомогою гетеротрофного харчування. Перенесення *Phalaenopsis* в умови *ex vitro* супроводжується підвищеним навантаженням на листя і коріння, як фотосинтезуючі органи (рис. 2.3.). Рослинам необхідно перейти до автотрофне харчування. Здатність до фотосинтезу в умовах *in vitro* не реалізується через наявність вуглеводів в живильному субстраті і низької концентрації вуглецю.



Рис.2.3. Укорінення та адаптація *Phalaenopsis*

Наразі період адаптації *Phalaenopsis* ускладнюється через труднощі переходу рослин до фотосинтезу пов'язані з низькою активністю ферментів, які фіксують кисень. Деякі автори рекомендують останні два тижні перед перенесенням в нестерильні умови витримувати рослини при підвищеному освітленні (10 000-15 000 лк) і вирощувати у відкритих посудинах. Нові листя, які розвиваються в таких умовах, частково здатні до активного фотосинтезу.

З іншого боку особливістю *Phalaenopsis* є наявність у нього повітряних коренів, здатних не тільки до поглинання води, але і до фотосинтезу. Це підвищує здатність адаптації орхідеї до нестерильним умов, що важливо для *Phalaenopsis* як повільно зростаючого рослинного організму.

Перенесені в нестерильні умови орхідеї вже мають первинні листя і коріння, але анатомічна будова їх тканин відрізняється від дорослих рослин. Вони схильні до впливу навколишнього середовища в значно більшому ступені, ніж дорослі рослини. Високий ступінь транспірації сприяє зневодненню зовнішніх тканин і пошкодження мембран. Дорослі рослини *Phalaenopsis* характеризуються високою водоутримувальною здатністю. Вони мають ряд анатомічних структур, що сприяють утриманню води. Молоді рослини, на відміну від них, мають тонкий шар кутикули і прорихи ще не здатні досить

НУБІП УКРАЇНИ
функціонувати. Це пов'язано з тим, що у молодих листків диференціація замикаючих клітин, так само як і всіх інших, виражена слабо.

У первинного листа через тонкий слабо розвинутий шар кутикули породи розташовані практично на поверхні листа, що підвищує ступінь їх вразливості. Позитивним є те, що для фаленопсиса характерна мала кількість

НУБІП УКРАЇНИ
породи. Для зниження транспірації при перенесенні орхідей в нестерильні умови в умовах адаптаційної кімнати чи теплиці застосовують ряд пристосувань для зволоження повітря, підтримання необхідної температури та освітлення.

Слід зазначити, що саме для культури *Phalaenopsis* як епіфітної орхідеї

НУБІП УКРАЇНИ
одним з найважливіших факторів мікроклімату є забезпечення достатнього повітрообміну. Недолік руху повітря найчастіше призводить до виникнення і розповсюдження грибних та інших інфекцій і загибелі всієї групи перенесених

для адаптації рослин орхідей [5, 6, 9].

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН

PHALAENOPSIS BLUME В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Метод культури ізольованих тканин є найпопулярнішою системою для отримання великої кількості нових рослин за короткий період часу. Нині відома велика кількість видів рослин, які розмножені культурою тканин в тому числі Орхідних.

Метою дослідження було вивчення особливостей мікроклонального розмноження в умовах *in vitro* *Phalaenopsis* Blume. Вивчали особливості впливу стерилізуючих реновин, типу експлантів та регуляторів росту на процес прискореного розмноження рослин *Phalaenopsis* Blume.

3.1. Особливості введення в культуру *in vitro* *Phalaenopsis* Blume

У експериментальній роботі для введення в культуру використовували різні типи експлантів (рис. 3.1.).



Рис. 3.1 Типи експлантів, що використовували для введення в культуру *in vitro* *Phalaenopsis* Blume

Для отримання асептичної культури відбирали здорові, візуально не ушкоджені рослини. Пагони материнських рослин, що несуть суцвіття і квіти, були використані для експерименту. Частини квітконосів тричі очищали ватою,

змоченою в етанолі (70%). Довжина кожного вузлового експланта 5-6 см. На

початку стерилізації пагони довжиною 3 см з одним квітконосом (брунькою),

попередньо обробляли у водного розчину, що складається з беномілу (1%), краплі

Твін 20 і 10% мильного розчину протягом 10 хв. Після чого експлантати

промивали стерильною дистильованою водою й укорочували обидва кінці

кожного експланта на 1,5 см. Отримані вихідні експлантати були 1 см завдовжки.

Під лусками, що прилягають до квіткових бруньок робили насічки, щоб краще піддавати бруньки впливу живильного середовища.

Залежно від типу експланта використовували різні стерилізуючі речовини та

підходи (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Стерилізація стеблових експлантів *Phalaenopsis Blume*

№ з/п	Стерилізуюча речовина	Концентрація, %	Кількість експлантів, шт.	Час, хв	Кількість експлантів на 5 добу, шт	
					загиблі	життєздатні
1	AgNO ₃	0,1	30	7	9	6
2				10	5	10
3	AgNO ₃	0,1	30	5	7	8
	NaClO	1,25		10		
4	AgNO ₃	1,0	30	5	2	13
	H ₂ O ₂	25,0		10		
5	NaClO	1,25	30	10		
6		1,25	30	15		
7	H ₂ O ₂	18,5	30	5		
8		18,5	30	10		

Використовуючи методи стерилізації з комбінуванням речовин та підбираючи експозиції нам вдалося звільнити рослинний матеріал від екзогенної грибною і вірусною інфекції. Використовуючи 1,25% NaClO з часом експозиції 15

хв і 70% етанол (30 сек.) було отримано 85% стерильних експлантів, з них життєздатних було 70%, що свідчить про високий вихід асептичних життєздатних культур. Зменшивши час експозиції до 10 хв. отримали 50% життєздатних експлантів.

Використання розчину H_2O_2 у концентрації 18,5% вихід асептичних експлантів з вегетативних частин сягав 83% за витримування 10 хв у розчині й триразовим відмиванням (рис. 3.2.). При зменшенні часу експозиції відсоток уражених експлантів збільшувався, при цьому вихід асептичних сягав – 45%.

Були проведені експеримент з використання комбінованої стерилізації, спочатку експланти витримували 70% етанолу – 20 сек., 2,5% – гіпохлориті натрію 10 хвилин, 0,1% нітраті срібла ($AgNO_3$) або перекису водню. За таких підходів вихід асептичних експлантів сягав майже 100% для обох способів, але при цьому життєздатність й здатність до розмноження зберігалась лише у 40% первинних експлантів.



Рис. 3.2. Первинні асептичні мікропаногони отримані з фрагментів квітконосів

Наведений режим стерилізації не пошкоджував тканини і не пригнічував розвитку рослин, але при цьому не забезпечував максимальну стерильність

експлантатів. Зазначимо, що послідовність та експозицію використання стерилізуючих реагентів визначають у процесі роботи емпіричним методом залежно від типу експлантату та ступеню його нафкованості.

Оптимальним для отримання асептичної культури *Phalaenopsis* Blume з частин квітконосів є використання 1,25% NaClO з часом експозиції 15хв, розчину H_2O_2 у концентрації 18,5% з експозицією 10 хв. За таких умов отримали до 85% асептичних та здатних до регенерації експлантів (рис. 3.3).

У свою чергу отримання асептичного незрілого насіння досягалось шляхом занурення стручка з насінням у розчин етанолу і прожарюванні його у полум'ї спиртівки декілька разів. Іншим варіантом було швидке занурення стручка у розчин 0,1 % $AgNO_3$ на 3-4 хв, після цього фламбування у полум'ї спиртівки. Такий метод дозволив отримати стерильне насіння, яке висівали на ЖС МС.



Рис. 3.3 Первинні асептичні протекормоподібні структури

3.2. Дослідження впливу компонентів живильного середовища на індукцію морфогенезу *in vitro* *Phalaenopsis* Blume

На етапі ініціації культури *in vitro* використали агаризовані ЖС за прописом МС та Кнудсона, доповнені $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП у поєднанні з $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК.

До всіх ЖС додавали активоване вугіддя $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$.

Встановлено, що використання ЖС, що містять регулятори росту рослин, стимулювало процеси регенерації у тканинах первинних експлантів представників *Phalaenopsis* у порівнянні з контролем (б/г МС).

Частота регенерації адвентивних протокормоподібних тіл на середовищах, доповнених регуляторами росту коливалась в межах від 51,0 до 86,8%, а середня кількість сформованих de novo мікропагонів – від 2,0 до 4,5 шт/експлант.

Було відмічено, що на початкових етапах, зокрема після висіву насіння на середовище, перші зміни на поверхні незначне набубнявіння, зміна кольору насіння, розростання тканини експланту тощо – відзначали через 56-60 днів культивування *Phalaenopsis* Blume *in vitro*. У середньому регенерація адвентивних пагонів – від появи випинання на поверхні експланту до формування зачатку (глобули) сягала 30-35 днів (рис. 3.4.).

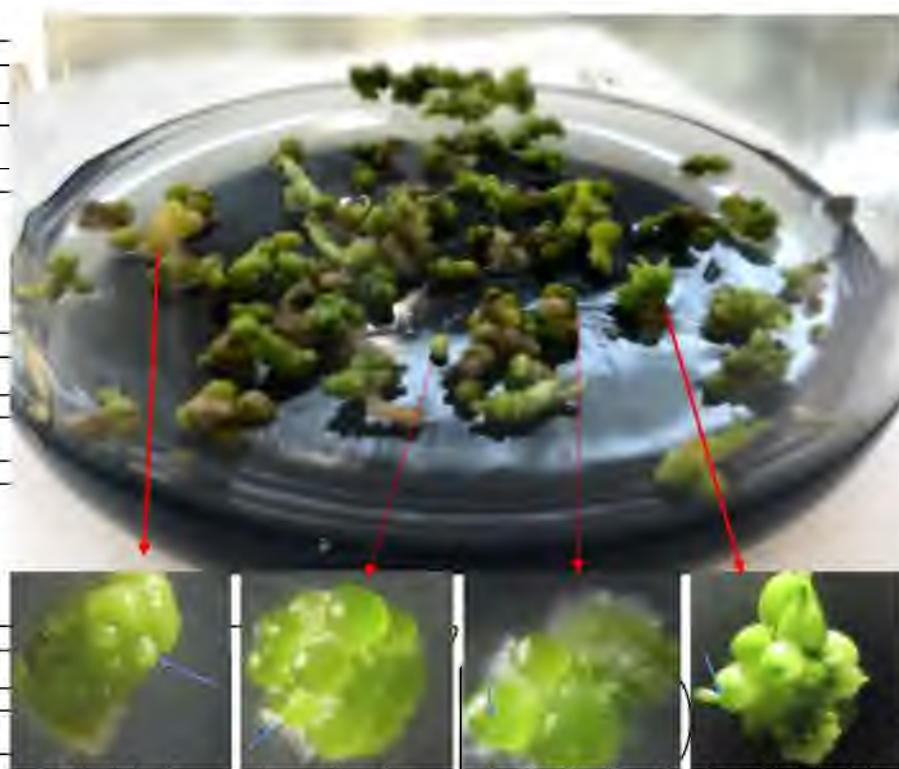


Рис. 3.4. Первинна регенерація адвентивних протокормоподібних тіл

Експлантати культивували на живильних середовищах, що містять 0,5-5,0 мг л⁻¹ БАП та 0,5-1,0 мг л⁻¹ ІОК, середовища з таким співвідношенням регуляторів росту стимулювали утворення адвентивних бруньок з протокоормоподібних структур (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1

Вплив концентрації БАП і ІОК на ріст адвентивних бруньок з протокоормоподібних структур

Середовище	БАП, мг·л ⁻¹	ІОК, мг·л ⁻¹	Відзначався	ТДЗ, мг·л ⁻¹	ІОК, мг·л ⁻¹	Відзначався
1 МС*	0,5	0,1	Повільний ріст	0,2	0,1	Без змін
2 МС*	1,0	0,2	Активний ріст	0,5	0,1	Активний ріст
3 МС*	1,5	0,1	Активний ріст	1,0	0,1	Без змін
4 МС*	2,0	0,2	Почорніння	2,0	0,2	Без змін

Зелені протокоормоподібні тіла (ЗПТ) з високою здатністю до розмноження були індуковані з кінчиків пагонів бруньок квітконосів, що мають 1 або 2 зачатків листків, використовуючи ЖС МС, що містить 0,1-0,2 мг л⁻¹ ІОК і 0,5-1,0 мг л⁻¹ 6-БАП. ЗПТ були субкультивовані на одному середовищі. Більше 1 000 ЗПТ було отримано з кількох бруньок на одному квітконосі протягом одного року. Після перенесення на ЖС МС, що не містить регулятора росту рослин, ЗПТ розвинулись в проростки. Результати свідчать про те, що методологічно можна було б використовувати в комерційних масштабах для вегетативного розмноження фаленопсису інших представників орхідних.

Формування калусної тканини на етапі ініціації в культурі *in vitro* не відбувалося, регенерація ЗПТ проходила шляхом прямого органогенезу.

Закладання додаткових бруньок найчастіше відмічали на неушкоджених частинах сплячих бруньок квітконосів, розташованих над поверхнею ЖС, проте їх формування відбувалося близько до ранової тканини (у місцях зрізів) (рис. 3.5, а). При цьому ділення ЗПТ на сегменти, стимулювало процеси регенерації на наступних пасажах.

За своєю природою орхідні схоже поводитись і в природних умовах, за рахунок поранення на квітконосі чи покривних лусках, може виникати регенерація за рахунок діяльності раневої чи латеральної меристеми).

У процесі експериментів зясували, що основний тип морфогенної реакції тканин експлантів у культурі *Phalaenopsis* Blume був прямий органогенез з ЗПТ. При цьому регенерація мікропагонів на етапі власне міроклонального розмноження проходила достатньо рівномірно.

У дослідженнях використовували ЖС за різним прописом, складом РРР та вітамінів. За період одного пасажу в кожному конгломераті ЗПТ утворювались подібні за розмірами та кількістю сформованих мікророслин зони (рис. 3.5., б).



Рис. 3.5. Регенерація мікропагонів на поверхні первинних експлантів *Phalaenopsis* Blume

На 40-45 день культивування мікропагони досягали 3,0-4,5 мм у діаметрі і склалися з 3-4 сферичних частин. Для подальшого формування мікророслин та їх розвитку збільшували кількість РРР та тривалість пасажу до 65-85 днів або пересадити їх на свіжі ЖС.

За даними експерименту не вдалось отримати найбільш значущих факторів, що впливали на формування великої кількості пагонів на етапі власне міроклонального розмноження (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив компонентів ЖС на регенерацію адвентивних пагонів з тканин квітконосів

Середовище	Добавка, мг·л ⁻¹						Кількість пагонів, шт	Частота регенерації, %
	6-БАП	B ₁	B ₆	PP	НОК	кінетин		
Контроль							1,9±0,6	50,4
5 МС*	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5		3,8±0,5	43,7
6 МС*	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	1,0	4,5±0,5	78,6
7 Кнудсона*	1,0	1,0	0,5	0,5	0,2		4,2±0,4	68,9
8 Кнудсона*	2,0	1,0	0,5	0,5			3,2±0,8	66,2
9 Кнудсона*	1,0	1,0		0,5			2,4±0,3	62,5

Можна відмітити лише ЖС 6 та ЖС 7, що характеризувались подібними показниками частоти регенерації й кількості сформованих мікропагонів. На інших ЖС відзначали зниження частоти формування ЗПТ.

Враховуючи це, було проведено додатковий експеримент з підбору ЖС для мікроклонального розмноження (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив мінерального складу живильного середовища та регуляторів росту на формування ЗПТ та рослин регенерантів *Phalaenopsis* Вліте в культурі

in vitro

PPP, мг·л ⁻¹	Мінеральна основа ЖС			
	МС		Кнудсона	
	Частота регенерації, %	Кількість пагонів, шт	Частота регенерації, %	Кількість пагонів, шт
Контроль	43,1	3,3±0,6	50,2	3,4±0,4
БАП 0,1	61,7	4,5±1,2	76,5	6,0±1,5
БАП 0,5	75,0	4,2±1,1	64,7	3,7±0,5
БАП 5,0	86,3	3,6±0,9	50,0	4,7±0,9
БАП 5,0+НОК 2,0	64,4	3,1±0,4	75,3	3,1±0,4
БАП 10,0+НОК 2,0	39,0	2,3±0,5	51,7	2,8±0,5
ТДЗ 0,1	71,7	4,5±1,2	41,8	4,4±1,1
ТДЗ 0,5	60,1	4,5±0,6	70,4	3,5±0,4
ТДЗ 5,0	58,0	3,7±0,8	46,2	4,7±1,7
ТДЗ 10,0+НОК 2,0	72,0	3,4±0,7	55,0	3,4±0,8
БАП 0,4+НОК 3,2+НОК 2,3	55,7	3,3±0,5	86,3	6,6±0,4
БАП 2,2+2,4-Д0,5	41,8	4,4±1,1	56,5	3,7±0,5

З усіх випробуваних ЖС високі показники росту та розвитку мікропагонів спостерігали на ЖС з додаванням $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ цитокінінів та $0,2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ауксинів (рис. 3.5).



Рис. 3.6. Розвиток ембріоподібних структур на ЖС з додаванням $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП та $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ НОК

Зокрема, на ЖС кнудсона доповненого $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП та $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ НОК та ЖС з $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ відсоток регенерації був найбільший й кількість утворених конгломератів сягала до 11 шт.

Збільшення концентрації цитокінінів (БАП та ТДЗ) у середовищі понад $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ пригнічувало пагоноутворення. Додавання комплексу ауксинів та великої кількості цитокініну характеризувалось найменшою морфогенною активністю з усіх використовуваних ЖС.

В цілому, внесення в живильне середовище екзогенних регуляторів росту впливало на ріст рослин на початкових пасажах, а вже починаючи з 5-6 пасажу активність пагоноутворення поступово зменшувалась.

Встановлено, що додавання в живильне середовище Кнудсона РРР $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП та $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ НОК індукувало формування адвентивних бруньок на 15-25 день культивування, тоді як на безгормональному ЖС період становив

45 днів. Ця комбінація регуляторів росту забезпечувала активну регенерацію мікропагонів та заодкоподібних структур і може вважатися оптимальною: середня кількість сформованих мікророслин на скеплант – $6,6 \pm 0,4$ шт, частота регенерації – 86,3%. В подальшому на ЖС такого складу утворювались повноцінні рослини-регенеранти (рис. 3.7.).



Рис. 3.7. Рослини-регенеранти *Phalaenopsis Blume*

На 40-45 день культивування мікропагони досягали 3,0-4,5 мм у діаметрі і склалися з 3-4 сферичних частин. Для подальшого формування мікророслин та їх розвитку збільшували кількість РРР та тривалість пасажу до 65-85 днів або пересадити їх на свіжі ЖС (рис. 3.8.).

Використання низьких концентрацій БАП та ТДЗ $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ на ЖС незалежно від мінерального складу призводило до формування жовтого,

морфогенного калюсу. При цьому частота утворення морфогенного калюсу не перевищувала 28,0%



Рис. 3.8. Утворення морфогенного калюсу на експлантах *Phalaenopsis Blume*

Формування додаткових утворень безпосередньо тканинами експланту на поверхні калюсу спостерігали лише через 8 тижнів культивування, що значно пізніше, ніж на середовищах, доповнених цитокинінами та ауксинами. Надалі хлорофільні зерна калюсної тканини давали початок мікропагонам, тобто провікав непрямий органогенез.

3.3. Вивчення впливу регуляторів росту на процес укорінення мікропагонів рослин *Phalaenopsis Blume* в культурі *in vitro*

В процесі розмноження рослин-регенерантів *Phalaenopsis Blume* було відмічено, що формування коренів проходило паралельно з утворенням інших морфогенних структур. Як правило явище індукції ризогенезу спостерігали в базальній частині, часто коріння утворювалось із калюсних тканин базальної частини. Формування коренів проходило протягом 14-21 дня. На кожному з експлантів формувалось по 3-6 повітряних кореня, які впродовж 25-38 діб досягали 4,0-6,0 см (рис. 3.9.).



Рис. 3.9. Рослини-регенеранти готові для адаптації. Враховуючі такі морфогенні процеси, окремим підбір ЖС для індукції ризогенезу не проводили. Формування коренів проходило одночасно з утворенням адвентивних пагонів на ЖС безпосередньо для мікроклонального розмноження.

3.4. Добір оптимального режиму адаптації рослин-регенерантів *Phalaenopsis Blume* до умов закритого ґрунту

Адаптацію сформованих рослин-регенерантів проводили шляхом поступового пристосування рослин до відмінних умов *de novo*.

Спочатку пробірки з рослинами відкривали на декілька годин, потім тижня час збільшували ще на 2-3 год.

Для адаптації використовували спеціальний субстрат для орхідей, оскільки він є універсальним. Розмір горщика обирали відповідно до розміру експланта. Загалом процес адаптації мікроклонально розмножених рослин проходив протягом 3 тижнів. Після цього отримані рослини можна було переносити для

вирощування у теплиці, для дорощування у горщиках та використовувати у квіткових композиціях та флораріумах (рис. 3.10.).



Рис. 3.10. Адаптовані рослини-реліквіанти *Phalaenopsis* Blume. (на 30 добу)

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов студійної адаптації рослини-реліквіанти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

ВИСНОВКИ

Для оптимізації умов вирощування помірних орхідних в культурі *in vitro* необхідні дані, що характеризують їх морфологічні параметри. Особливо важливим є вивчення ранніх етапів онтогенезу орхідних, оскільки саме вони визначають темпи зростання, процеси морфо- та органогенезу, що в результаті позначається на стадіях розвитку рослин-регенерантів.

У результаті досліджень встановлено, що мікроклональне розмноження є найефективніший спосіб для масового розмноження орхідних з метою використання як горщикової культури, кімнатного озеленення й флористичних цілей.

З'ясовано, що метод асимбіотичного культивування паростків *in vitro* дозволяє істотно зменшити час протікання ранніх стадій онтогенезу орхідних.

Досліджено оптимальну стерилізацію для отримання асептичних життєздатних експлантів та протокормів, спочатку етиловим спирт 70% протягом 1 хв, далі 0,1% AgNO_3 (нітрат срібла) – 3-4 хв, споліскували в стерильній дистильованій воді – 2 рази по по 3-5 хв. Досягнуто 85% ефективності стерилізації.

З'ясовано, що у паростків отриманих асимбіотичним шляхом, значно швидше формуються первинний мікропагін з поступовим розростанням базальної частини.

Підібрано складові живильного середовища це МС додаванням кінетину $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, та $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугля, використання у складі ЖС активованого вугля має успішний вплив на формування й ріст пагонів. Активоване вугілля адсорбує токсичні речовини, вторинні метаболіти, виділяють експланти. Для масового розмноження живильне середовище МС додаванням кінетин $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, та $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугля, ідеально підходить для представників *Phalaenopsis* Blume воно стимулює активне утворення нових меристематичних центрів на тканинах протокорму, що сприяло формуванню конгломератів вторинних протокормів, що активно проявляли здатність до органогенезу.

Встановлено, що додавання в живильне середовище Кнудсона регуляторів-росту $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП та $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ НОК індукувало формування адвентивних бруньок на 15-25 день культивування, тоді як на безгормональному ЖС період становив 45 днів. Ця комбінація регуляторів росту забезпечувала активну регенерацію мікропагонів та заодкоподібних структур і може вважатися оптимальною: середня кількість сформованих мікророслин на експлант – $6,6 \pm 0,4$ шт., частота регенерації – 86,3%.

Вияснили що на процес культивування рослинного матеріалу в умовах *in vitro*, впливає температура, аерація, освітлення, вологість та осмотичний тиск живильного середовища. Та підбрали оптимальний режим температури $25-26^\circ\text{C}$, яка вважається оптимальною для більшості культур.

За результатами експерименту сформували оптимальну комплексну методику мікроклонального розмноження, що забезпечила зменшення термінів культивування рослин *in vitro* в 2 рази.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за дотриманням умов ступінчастої адаптації рослини-регенеранти *Phalaenopsis* Blume мали 98% адаптації рослин до умов *ex vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрахам Д., Адлер М., Алдерман Л. Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях. Вашингтон: Типография Правительства США, 2007. 360 с.
2. Аверьянов Л. В. Определитель орхидных (*Orchidaceae* Juss.) Вьетнама. СПб.: Мир и семья, 1994. с.432.
3. Андропова Е.В. О биологическом разнообразии, семенном размножении *in vitro* и репатриации орхидных. *Вестник Тверского государственного университета*, 2007. №7 (35). С. 8-11.
4. Антипина В.А. Размножение редких тропических орхидных *in vitro*. «Биология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира»: 2008 рік : Матер. II Всерос. науч. практ. конф., 19-21 августа 2008 Белгород, 2008. С. 29-33.
5. Белицкий И.В. Орхидеи. Практические советы по выращиванию, уходу и защите от вредителей и болезней. Изд. АСТ, 2001. 153 с.
6. Білоус С.Ю. Біотехнологічні аспекти розмноження великовікового дерева дуба Максима Залізняка в умовах *in vitro*. *Науковий вісник Національного університету*, 2012, 2. С. 213-217
7. Білоус С.Ю. Лісове і садово-паркове господарство Біотехнологічні аспекти адаптації рослин-регенерантів *Populus tremula* L. до умов закритого та відкритого ґрунту. *Науковий вісник НУБіП України. Серія Лісівництво та декоративне садівництво*. 2015, Вип. 219. С. 198-205.
8. Білоус С.Ю. Формирование меристематических структур в каллуса *Populus tremula* L. в процессе непрямого морфогенеза *in vitro*. *Міськітінкyste*. 2014, 1 (75). С. 61-66.
9. Буюн Л.І., Ковальська Л.А., Вахрушкін В.С. Особливості морфологічної будови пагонової системи *Paphiopedilum insigne* Pfitz. (*Orchidaceae* Juss.). *Інтродукція рослин* 2003. № 4. С 45.
10. Білоус С.Ю., Радченко В.П., Магяшук Р.К. Особливості морфогенезу *Lysimachia punctularia* L. при введенні в культуру *in vitro*. *Лісове і садово-*

паркове господарство. 2016, 6 №10. <http://ejournal.studnubip.com/zhurnal-10/ukr/rvh-bsyu-mrk/>

11. Буюн Л.І., Ковальська Л.А., Вахрушкін В.С. Тропічні орхідні (*Orchidaceae* Juss.): репродуктивна біологія та структурно функціональні адаптації за умов збереження *ex situ*. *Інтродукція рослин*. 2003, № 4.

12. Варлыгіна Т.И. Охрана орхидных (*Orchidaceae*) в России. *Вест. Тв. ГУ, серия Биология и Экология*. 2007, №7 (35). С. 70-74.

13. Вахрушкін В.С. Представники роду *Paphiopedilum* Pfitz. (*Orchidaceae* Juss.): морфологія, екологія, інтродукція: Автореф дис. кандидата біол. наук. *Національний ботанічний сад ім. М.М.Гришка НАН України*. 2010. С. 21.

14. Вахрамеева М.Г. Изучение онтогенеза и многолетней динамики популяций наземных орхидных на примере любки зеленоцветковой *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichenb. : Автореф дис. кандидата біол. наук / Національний ботанічний сад ім. М.М.Гришка НАН України, 2010. К. 23 с.

15. Вельмяйкин И.Н., Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Влияние регуляторов роста на размножение и рост побегов *Cymbidium hybridum* hort. *In vitro*. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, Биология*. 2013, №3(1). с. 133-137.

16. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Культура *in vitro* *Stevia rebaudiana* Bert. *Флора и растительность Алтая*. 1996. Барнаул: Алтай. Унта. С. 140-142.

17. Гавриленко Н.А. Сравнительное изучение популяций пыльцеголовников в естественных и искусственных сообществах заповедника «Кодры» / Заповедники СССР – их настоящее и будущее. Ч. 2. Ботаника, лесоведение, почвенные исследования, 1990. Новгород. С. 29-32.

18. Гапоненко Н.Б. Модификационная изменчивость некоторых видов рода *Orchis* L. в связи с их интродукцией и акклиматизацией // Особенности акклиматизации многолетних интродуцентов, накапливающих биологически активные вещества. – Краснодар: Кубанский гос. аграрн. ун-т, 1995. С. 46-50.

19. Герасимов С.О., Журавлев И.М. Орхидеи. М.: Росагропромиздат, 1988. 208 с.

20. Гродзинский А.М. Биология орхидей. Загадки и перспективы // Охрана и культивирование орхидей. Киев : Наукова думка, 1983. С. 3–6.

21. . ДБН В.2.5-28-2006 «Природне і штучне освітлення»: Державні будівельні норми України. К. : Мінбуд України, 2006. 96 с..

22. Загультський М.М. Зміни позицій орхідних (*Orchidaceae* Juss.) за останні 200 років на заході України та їх охорона // Міжнар. наук. конф. «Охорона і культивування орхидей». К. : Наук. думка, 1999. С. 54–56.

23. Іванніков Р.В. Біологія розвитку видів роду *Laelia* Lindl. (*Orchidaceae* Juss.) в умовах оранжерейної культури та культури *in vitro*. Автореф. дис. канд. біол. наук / Національний ботанічний сад ім.М.М.Гришка НАН України. К., 2001. 23с.

24. Іванніков Р. В., Лаврентьева А. Н. Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов. // *Материалы междунар. конф., посвящ. 60-летию ГБС РАН.* М. 2005. С. 192–193.

25. Іванніков, Р. В., Лаврентьева, А. Н. Семенное размножение *Psichopsiella limminghei* Lindl. (*Orchidaceae* Juss.) в условиях асептической культуры / *Материалы междунар. конф., посвящ. 60-летию ГБС РАН.* – М., 2005. С. 190–191.

26. Карначук Р. А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и формирование растений, выращенных на свету разного спектрального состава. *Физиология растений* 1998. Т. 45, №6 С. 925–934.

27. Колосмейцева Г.Л., Герасимов С.О. Орхидеи. Кладезь-Букс, 2005. 168 с.

28. Колосмейцева Г.Л. Орхидеи и их опылители. *Наука и жизнь.* 2002. № 8. С. 141-145.

29. Кондратюк Е.Н., Остапко В.М. Редкие, эндемичные и реликтовые растения юговостока Украины в природе и культуре. Киев : Наук. думка, 1990. 152 с.

30. Круглова Н.Н. Морфогенез *in vitro* клеток каллусов различного происхождения. *Цитология*. 2007. С. 762-763.

31. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Репродуктивная стратегия орхидных умеренной зоны. *Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции.* // Ред. Т.Б. Батыгиной. СПб. : Мир и семья, 2000. С. 510-513.

32. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. О методах размножения орхидных умеренной зоны в культуре *in vitro*. *Бюл. ГБС*. 1998. Вып. 176. С. 125-131.

33. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Прорастание семян и развитие проростков *in vitro* у некоторых орхидных умеренной зоны. *Экология и интродукция растений на Урале*. Екатеринбург, 1991. С. 39-43.

34. Кушнир, Г. П., Будак, В. Е. Опыт клонального микроразмножения орхидей. Киев : Изд-во ЦРБС АН УССР, 1983. С. 84-86.

35. Лаврентьева А.М. Насіннєве розмноження *Dendrobium draconis* Rchb.f. (*Orchidaceae* Juss.) у культурі *in vitro*. *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка* Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. 2005. № 9. С. 36-37.

36. Маракеев О.А., Титова О.В. Особенности ростовых процессов у орхидных (*Orchidaceae*) разного возраста в зависимости от некоторых экологических факторов. *Современные проблемы биологии, химии, экологии и экологического образования*. Ярославль: ЯрГУ, 2001. С. 185-190.

37. Мосякин С.Л. Сучасні погляди на філогенію та положення родини *Orchidaceae* Juss. в системі однодольних рослин. *Інтродукція рослин*. 2006. 2. С. 3-14.

38. Попкова Л.Л., Митрофанова О.В. Морфогенез некоторых орхидных Крыма при семенном размножении в условиях *in vitro*. *Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур*, 1997. С. 178-181.

39. Попкова Л.Л., Теплицька Л.М., Астапенко Н.А. Особливості початкового етапу онтогенезу при насіннєвому розмноженні субтропічної наземної орхідеї *Bletilla striata* L. *Таврійський науковий вісник*. 2012. 80 ч. 2. С. 32-36.

40. Селезнева В.А. Тропические и субтропические орхидеи. М. : Наука, 1965. С.170.

41. Собко В.Г. Морфогенетические особенности орхидей трибы *Orchidae* флоры Украины. Киев : Наук. думка, 1983. С. 27-29.

42. Собко В.Г., Нефедова О.Н. *Epipactis palustris* L. в природе и в первичной культуре. Охрана и культивирование орхидей. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. Киев: Наук. думка, 1983. С. 45-47.

43. Собко В.Г. Орхідеї України. К. : Наук. думка, 1989. С. 192 .

44. Степанюк, Г. Я. Размножение тропических и субтропических растений *in vitro* в Сибирском ботаническом саду. М., 1998. С. 198-199.

45. Степанюк Г. Я. Проблемы интродукции растений и отдаленной гибридизации. М., 1998. С. 196-197.

46. Степанюк Г.Я. , Хоцкова Л.В. Биологические особенности видов рода *Phalaenopsis* Blume при выращивании в оранжереях Сибирского ботанического сада. *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2012, № 4 (20). С. 105-117.

47. Фатеева Е. В., Мокшин Е. В., Лукаткин А. С. Влияние концентрации минеральной основы среды и регуляторов роста на органогенез цимбидиума гибридного в культуре *in vitro*. *Труды Карельского научного центра РАН.* 2013. № 3. С. 143-148.

48. Чайлахян, М.К. Регуляторы роста в жизни растений и в практике сельского хозяйства. *Вестник АН СССР.* 1982. № 1. С. 11-26.

49. Черевченко Т.М., Буюн Л.І., Ковальська Л.А., Вахрушкін В.С. Орхідеї. Київ: Просвіта, 2001. С. 224.

50. Черевченко Т.М., Буюн Л.І., Ковальська Л.А. Запилювальні стратегії у орхідних (*Orchidaceae* Juss.). *Укр. ботан. Журн.* 2010. 5. С. 63-64.

51. Черевченко Т. М., Буюн Л. І., Ковальська Л. А. Орхідеї В'єтнаму в колекції ЦБС НАН України *Матеріали наук. конф. з охорони і культивування орхідеї.* Київ, 1999. С. 133-135.

52. Черевченко Р.В., Буюн Л.І., Іванніков Р.В. Сучасні біотехнології в інтродукції видів тропікогенних флор як метод збереження їх генофонду *ex situ*

та збагачення рослинних ресурсів України. *Збереження та збагачення рослинних ресурсів шляхом інтродукції, селекції та біотехнології: монографія. Зб. наук. праць.* К.: Фітосоціоцентр, 2012. С. 432.

53. Черевченко Т.М. Тропические и субтропические орхидеи / Отв. ред. Д.Н. Доброчаева. *НАН Украины, Центр. бот. сад им. Н.Н. Гришко.* Киев : Наукова думка, 1993. С. 254.

54. Шейко О.А., Мусатенко Л.І. Сучасний стан дослідження особливостей симбіотичного та асимбіотичного розмноження орхідних. – *Інтродукція рослин*, 2010, № 4, С. 21-27.

55. Шейко О. А., Мусатенко Л. І.. Особливості морфогенезу паростків орхідних у культурі *in vitro* та *in vivo* – *Вісник харківського Національного університету, серія Біологія*. 2011, С. 60-65.

56. Шосер Г. Орхидеи. Выращивание в домашних условиях. Разведение и уход. М.: Интербук-бизнес, 1997. С. 132.

57. Arditti J., Ghani A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 2000. Vol. 145. P. 367-421.

58. Averyanov L.V., Averyanova A.L. Update checklist of the orchids of Vietnam. Hanoi: *Vietnam National University Publishing House*, 2003. 102 p.

59. Bonardeaux Y., Brundrett M., Batty A. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. // *Mycol. Res.* 2007. V. 111. P. 51-61.

60. Braem G. *Paphiopedilum*. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, 1987. 256 p.

61. Chowdhury I., Rahman A.R.M., Islam M.O., Matsui S. Effect of plant growth regulators on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plant-lets of *Doritaenopsis* orchid. *Biotechnology*. 2003. V. 2. P. 214-221.

62. Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W., Barrett R.L., Orchid conservation - a global perspective. *Natural History Publication*. 2003. P. 1-24. ○○

63. Cribb Ph. The genus *Paphiopedilum*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998. P. 427.

НУБІН УКРАЇНИ

64. Dressler R.L. The orchids. Natural history and classification. London: Harvard Univ. Press, 1981. 332 .

65. Duan, J.-X., Chen, H., & Yazawa, S. In vitro propagation of Phalaenopsis via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*. 1996.

15(3), 133-137

66. Rasmussen H. The vegetative architecture of orchids. *Lindleyana*. 1986. Vol. 1. N 1. P. 4250.

67. Roberts J. A., Beale C. R., Benseler J. C. et al. CITES Orchid Checklist. Vol. 1. Kew: *Royal Botanic Gardens*, 1995. P. 136.

68. Sinha, P., Jahan, M. A. A., Munshi, J. L., & Khatun, R. High Frequency Regeneration of Phalaenopsis amabilis (L.) Bl. cv. Lovely through In vitro Culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2011. 20(2). doi:10.3329/ptcb.v20i2.6913

69. Tokuhara, K., & Mii, M. Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*. 1993. 13(1). doi:10.1007/bf00232306.

70. Watson J. Paphiopedilum delenatii rediscovered. *AOS Bulletin*, 1994. Vol. 63. N 1. P. 294.

71. Vijay R., Raina S. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 2000. P. 319-330.

72. Yam T.W., Arditti J.. Orchid seed germination and micropropagation: a short history. *Malayan Orchid Review*. 1990. 24, P. 38-47.

73. Yan J.F., Piao X.C., Sun D., Liana M.L.. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of Oncidium ‘Sugar Sweet’. *Scientia Horticulturae*. 2010. 125. P. 712-717.

74. Ziv M. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005. 81, P. 277-285.

75. Zhan-huo T., Yi-bo L., Cribb P. J. et al. A preliminary report on the population size, ecology, and conservation status of some Paphiopedilum species (*Orchidaceae*) in Southwest China. *Lindleyana*. 1999. Vol.14. N 1. P. 12-23.