

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри екобіотехнології та  
біорізноманіття

\_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Морфогенез та розмноження in vitro *Orchidaceae vanda*»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук,  
доцент, завідувач кафедри  
екобіотехнології та  
біорізноманіття

Олена КВАСКО

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи**

Доктор сільськогосподарських  
наук, професор кафедри  
екобіотехнології та  
біорізноманіття

Оксана КЛЯЧЕНКО

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Виконала

Діана ШИШКІНА

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**КИЇВ – 2025**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри екобіотехнології та  
біорізноманіття

Олена КВАСКО

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту**

Шишкіна Діана Сергіївна

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Морфогенез та розмноження in vitro Orchidaceae vanda»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024р. №1880

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:

список літературних джерел; перелік поживних середовищ для культивування *Rosmarinus officinalis* L., перелік методик для досліджень

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Отримання асептичних експлантатів Orchidaceae vanda.
2. Ведення в культуру in vitro Orchidaceae vanda.
3. Особливості процесу калюсогенезу Orchidaceae vanda.
4. Особливості індукції прямого та непрямого морфогенезу Orchidaceae vanda.
5. Укорінення рослин-регенерантів Orchidaceae vanda;
6. Адаптація рослин-регенерантів Orchidaceae vanda.

Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

**Керівник бакалаврської  
кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Оксана КЛЯЧЕНКО**

**Завдання прийняв до  
виконання**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Діана ШИШКІНА**

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему „Морфогенез та розмноження *in vitro* Orchidaceae vanda” складається з 65 сторінок друкованого тексту, містить 12 інформаційних таблиць та 9 рисунків.

Містить в собі наступні розділи: огляд літератури; матеріали та методи дослідження; результати дослідження; висновки; список використаної літератури;

Дослідження проводилися в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Метою роботи було введення в культуру *in vitro* Orchidaceae Vanda та вивчення особливостей культивування даного виду орхідних і виявлення найбільш сприятливих умов для морфогенезу.

Для отримання безвірусного посадкового матеріалу орхідеї Ванда нами використано метод культури *in vitro* апікальних меристем. Розроблена схема отримання асептичного матеріалу, яка полягає в поетапній обробці експлантатів: 70% етиловий спирт – 1 хв, 1% розчин «Famosept» – 15 хв або 0,1 % діациду – 20 хв, 15% перекис водню – 15 хв, 10% «Chlorox» – 20 хв. Приведено результати досліджень калюсогенезу та прямого і непрямого морфогенезу в культурі *in vitro* експлантатів Orchidaceae Vanda, їх залежність від вмісту регуляторів росту в живильному середовищі. При отриманні непрямого морфогенезу необхідно враховувати вік калюсних тканин. Ріст та інтенсивне пагоноутворення орхідеї відмічали на живильному середовищі МС, доповненому кінетином. Найкращим для укорінення виявилось середовище МС з четвертинною концентрацією кінетину. На даному середовищі культура дала найбільший приріст біомаси за термін у 30 днів. При цьому отримали найвищий коефіцієнт розмноження серед інших, що склало 1:4, саме тому його слід обирати для розмноження культури в умовах *in vitro*.

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b>		4
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ</b>		7
<b>ВСТУП</b>		8
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>		10
1.1	Біологічні особливості Орхідеї Ванда (Orchidaceae Vanda)	10
1.2	Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування	13
1.2.1	Отримання безвірусного посадкового матеріалу орхідеї Ванда	16
1.3	Використання методу мікроклонального розмноження в промисловому квітникарстві	21
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>		25
2.1.	Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи	25
2.2	Матеріали дослідження	29
2.3	Методи дослідження	29
2.3.1	Стерилізація експлантатів орхідеї Ванда та умови культивування рослин	31
2.3.2	Підбір живильних середовищ для культивування ізольованих тканин орхідеї Ванда	34
2.3.3.	Отримання калюсу із різних експлантатів орхідеї Ванда та непрямий морфогенез	35

2.3.4	Отримання прямого морфогенезу та укорінення рослин орхідеї Ванда	37
2.3.5	Адаптація рослин-регенерантів <i>Orchidaceae vanda</i>	38
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>		40
3.1	Введення в культуру <i>in vitro</i> та отримання асептичних експлантатів орхідеї Ванда	40
3.2	Особливості калюсогенезу орхідей роду Ванда	43
3.3	Особливості непрямого морфогенезу орхідей роду <i>Vanda</i>	45
3.4	Пагоноутворення із верхівкових пагонів орхідеї	48
3.5	Пагоноутворення <i>Orchidaceae Vanda</i> із листкових експлантатів з повітряними коренями і калюсом	49
3.6	Різогенез рослин-регенерантів орхідеї <i>Vanda in vitro</i>	51
<b>ВИСНОВКИ</b>		54
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>		55
<b>Додатки (копії публікацій)</b>		59

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,  
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

БАП – 6-бензиламінопурин

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

НОК –  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота

МС – середовище Мурасіге і Скуга

МКР – мікроклональне розмноження

ЖС – живильне середовище

## ВСТУП

Орхідеї роду *Vanda* є одними з найяскравіших представників родини *Orchidaceae*. Вони вирізняються своєю декоративною привабливістю, різноманітністю форм та тривалим, насиченим цвітінням. Завдяки цим характеристикам *Vanda* здобули популярність у всьому світі, зокрема й в Україні, серед любителів і професійних квітників. Ці рослини належать до епіфітів або літофітів тропічних регіонів, що природно зростають у Південно-Східній Азії, на Філіппінах, в Індонезії, північній Австралії та Гімалаях.

Особлива увага до родини *Vanda* зумовлена не лише їхньою естетичною привабливістю, а й високою комерційною цінністю. Це робить їх важливим об'єктом для декоративного садівництва та масового розмноження. Однак традиційні способи розмноження, такі як насінневий метод і вегетативне розмноження, мають певні обмеження. Вони є недостатньо ефективними для промислового виробництва через тривалий цикл розвитку та підвищений ризик вірусного зараження.

У зв'язку з цим надзвичайно актуальним стає розвиток сучасних біотехнологічних рішень для розмноження *Vanda*. Зокрема, мікроклональне розмноження дозволяє отримувати велику кількість генетично ідентичних та безвірусних рослин. Цей метод сприяє збереженню біорізноманіття, підвищенню ефективності вирощування та забезпеченню стабільного постачання якісного посадкового матеріалу.

Дослідження біотехнологічних особливостей орхідей роду *Vanda* та вдосконалення методів їх мікроклонального розмноження є ключовими напрямками розвитку сучасного рослинництва, біотехнологій та збереження декоративної флори.

*Метою даної роботи є* дослідження специфіки мікроклонального розмноження орхідей роду *Vanda* та аналіз сучасних методів створення оздоровленого, безвірусного посадкового матеріалу в умовах *in vitro*.

*До завдань роботи слід віднести:* аналіз наукових джерел, в яких описані сучасні методи мікроклонального розмноження орхідей; вивчення біологічних та

морфологічних характеристик орхідей роду *Vanda*; дослідження методів оздоровлення посадкового матеріалу від вірусних інфекцій; розробка практичних рекомендацій щодо застосування мікроклонального методу розмноження *Vanda* для промислових цілей.

***Об'єктом дослідження*** є орхідея роду *Vanda* (*Orchidaceae Vanda*).

***Предметом дослідження*** є морфогенез та розмноження орхідних родини *Vanda* в умовах культури *in vitro*.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Біологічні особливості Орхідеї Ванда (Orchidaceae Vanda)

Родина Орхідних (Orchidaceae) є однією з найбільших і найрізноманітніших груп покритонасінних рослин, включає орхідеї роду Ванда. Близько 80 видів складають цей рід, більшість з яких зустрічаються в північній Австралії, Філіппінах, Індонезії та Південно-Східній Азії [6].

Форма, колір і аромат квітів, а також тривалий період цвітіння роблять Ванду одним з найяскравіших представників орхідей з точки зору декоративної цінності [1].

Моноподіальний тип росту та вертикальний розвиток головного стебла є характеристиками представників роду Ванда. Дорослі рослини можуть мати висоту від 15 до 100 см, залежно від виду та умов утримання. Крім того, існують крихітні різновиди, які досягають розміру лише 5–7 см [2]. Стебло зазвичай потовщене, циліндричне та має ремінцеподібне листя, розташоване у два ряди. Як адаптація до епіфітного способу життя, шкірясте, м'ясисте, видовжене листя виконує як фотосинтетичну, так і водозберігаючу функцію[3].



Рис. 1.1. Рослини родини Orchidaceae Vanda

Пазухи листків несуть пухкі суцвіття вади. Вид залежить від того, чи суцвіття пониклі, чи прямостоячі. Квіти бувають різних розмірів і кольорів, від фіолетового та синього до білого та жовтого, і часто мають унікальні смужки або плями. Запилювачів, таких як бджоли, мухи та метелики, вони приваблюють своїм приємним ароматом [4].

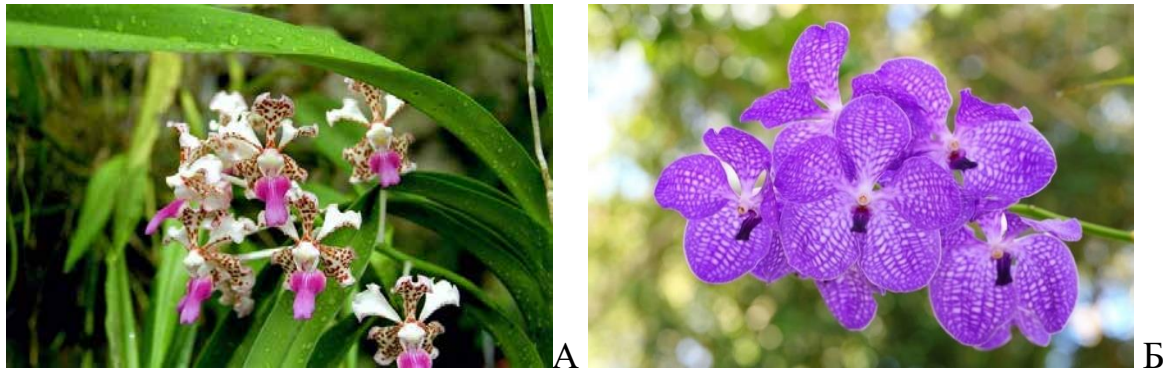


Рис.1.2. Різновиди квітів орхідеї Ванда: А – дрібні, Б – великі

Однією з найхарактерніших рис *Vanda* є наявність розвиненої повітряної кореневої системи, що дозволяє цим орхідеям виживати в епіфітних умовах — на деревах або скелях без доступу до ґрунту. Корені мають товстий веламен — багатошарову губчасту тканину, яка активно поглинає вологу з повітря, дощів і роси та забезпечує захист від зневоднення й перегріву [8]. Цей механізм дозволяє рослині швидко накопичувати вологу під час короткочасних опадів у тропічному кліматі [5].

На додаток, повітряні корені *Vanda* здатні до фотосинтезу завдяки наявності хлорофілу у зовнішніх шарах тканин, що забезпечує рослині додаткове джерело енергії. Це особливо важливо в умовах високого освітлення, якого вимагає культура для нормального розвитку [2, 4].



Рис.1.3. Коренева система орхідеї Ванда.

Також варто зазначити, що розмноження Ванди в природних умовах відбувається насіннєвим методом і це є дуже складним процесом. Оскільки насіння рослин не містить ендосперму і тому не в змозі прорости самотійно.

Проростання можливе лише за допомогою мікоризних грибів, які забезпечують ембріон поживними речовинами, характерним для всіх орхідей [7]. Природне відтворення насіння - це дорогий і небезпечний метод відтворення через ці проблеми.

У зв'язку з цим методи мікроклональної репродукції, такі як вирощування меристеми та *in vitro*, стали надзвичайно популярними в декоративному вирощуванні квітів. Ці біотехнології дозволяють виробляти велику кількість генетично однакових, здорових рослин, які підтримують морфологічні та декоративні характеристики матері [5]. Це має надзвичайно важливе значення як для збору рідкісних сортів, так і для промислових саджанців.

Фітопатологічні аспекти. Вирощуючи рослини Ванди за допомогою мікроклональних методів, є кілька проблем, пов'язаних із вразливістю тканини до загибелі клітин, особливо у внутрішніх частинах. Дослідження показали, що *Ex vitro*, взяті з повітряних коренів або молодих пагонів, демонструють більшу стійкість до окислювального стресу та мають кращу регенерацію [9].

**Вирощування *Vanda* потребує специфічних умов, що наближають середовище до природного:**

- температура: +22...25 °C, з змінами вночі до +18 °C;
- інтенсивне розсіяне освітлення (не менше 12 000–15 000 лк);
- висока вологість повітря — 70–90%;
- активна вентиляція, що запобігає застою вологи та розвитку патогенів [3, 4].

Ці рекомендації слід розглядати не лише у парникових чи будинку, але і при вирощуванні *in vitro*, де забезпечення стерильного мікроклімату є життєво важливим для регенерації рослин. Особливу увагу слід приділити фітопатологічним аспектам вирощування *Vanda*, адже чутливість тканин до некрозів, особливо у міжвузлях, може стати серйозною перешкодою під час культивування в лабораторних умовах. Як показали результати досліджень, експлантати з калюсом або повітряними коренями мають вищу стійкість до зараження і менше уражаються некрозами.

Орхідеї Ванда демонструють спеціальні біологічні зміни, як і їх унікальна форма, зв'язки з грибами та їх високою красою. Що стосується збереження, вирощування та використання біотехнологій для відтворення цих рослин, ці фактори слід враховувати. Їх відмінні біологічні особливості та крихкість роблять Ванду вирішальним предметом для вивчення в таких сферах, як рослинна технологія, біорізноманіття та сучасне вирощування квітів [10].

Таким чином, *Orchidaceae Vanda* представляє ряд унікальних біологічних рис — від анатомії до симбіотичних зв'язків, які слід враховувати при збереженні біорізноманіття, вирощуванні в умовах закритого ґрунту або мікроклональному розмноженні. Ці знання є особливо актуальними в умовах сучасного біотехнологічного виробництва та глобального зниження популяцій рідкісних видів.

## **1.2. Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування**

З розвитком біотехнологій та аграрної науки, методи, що дозволяють зберігати та ефективно розмножувати рослини, набувають все більшого значення. Серед них важливе місце займає мікроклональне розмноження — процес, який активно використовується для масового розмноження цінних видів рослин. Цей метод не лише допомагає зберігати генетичні ресурси, а й вирішує низку практичних завдань у селекції, розсадництві та охороні біорізноманіття. Одним із яскравих прикладів є застосування мікроклонального розмноження для орхідей роду *Vanda*, які мають високу декоративну та наукову цінність [12, 13].

Мікроклональне розмноження — це метод, що передбачає вирощування рослин в умовах *in vitro*, де рослинні клітини мають здатність відновлювати цілу рослину [6]. Завдяки цій властивості можна отримати точно такі ж рослини, як материнські, що є надзвичайно важливим для збереження рідкісних і важливих видів.

Вибір та підготовка експлантів. Етап відбору експлантів є одним із найважливіших в процесі мікроклонального розмноження, оскільки саме від

якості початкового матеріалу залежить подальша успішність культивування. Як експланти можуть використовуватися різні частини рослин, такі як апікальні або пазушні бруньки, фрагменти стебел, листя, повітряні корені або меристемні тканини. Кожен з цих типів експлантів має свої особливості, і їх вибір безпосередньо впливає на ефективність процесу [12, 13].

Для орхідей *Vanda* особливо доцільно використовувати молоді, ще не здерев'янілі повітряні корені або верхівкові бруньки, оскільки ці тканини мають високу регенеративну здатність і меншу схильність до зараження патогенами. Крім того, важливим є фізіологічний стан рослини, а також умови, за яких проводиться збір матеріалу, щоб уникнути контамінації [14].

**Стадії мікроклональної пропагації.** Процес мікроклонального розмноження складається з кількох ключових етапів, кожен з яких має свої особливості та вимоги:

- ініціація культури — на цьому етапі експлант вводять в стерильні умови, що допомагає уникнути контамінації та забезпечує нормальний розвиток;
- індукція морфогенезу — під впливом фітогормонів (цитокінінів та ауксинів) стимулюється утворення калюсу або мікропагонів, що є основою для подальшого розмноження;
- розмноження — на цьому етапі проводиться багаторазовий поділ тканин, що дозволяє отримати велику кількість ідентичних рослин;
- укорінення — формування кореневої системи необхідне для забезпечення життєздатності майбутніх рослин;
- адаптація до умов поза лабораторією (екзовітру) — цей етап передбачає поступовий перехід рослин до умов теплиць або відкритого ґрунту з контролем за температурою, вологою та освітленням [16].

Для досягнення успіху в мікроклональному розмноженні необхідно дотримуватися певних умов культивування. Одним із найпоширеніших середовищ є середовище Мурашіге і Скуга, яке зазвичай доповнюється різними регуляторами росту [11]. Для орхідей роду *Vanda* доцільно використовувати концентрацію бензиламінопурину (BAP) від 0,5 до 1,0 мг/л і індолілмасляної

кислоти (ІВА) в межах 0,1–0,3 мг/л для стимулювання морфогенезу [14, 16]. Температура в лабораторії повинна варіюватися в межах 24–26°C, рівень освітленості — близько 2500 лк, а вологість — 70–90% [15].

Мікроклональне розмноження є потужним інструментом для масового виробництва генетичних рослин, і його використання має широкий спектр діагностики практичних навичок. У випадку з орхідеєю роду *Vanda*, це дозволяє зробити особливе обличчя. Тому що це робоче продуктивне відтворення, унікальне для проростання насіння, наприклад, робота з мікоризними-фунгами [14].

Відповідність у всіх умовах вирощування є надзвичайно важливим для ефективного вирощування *Vanda* орхідей *in vitro*. Цей метод дозволяє підтримувати безліч генетично однакових рослин, але успіх процесу залежить від точного контролю на всіх етапах. Навіть незначні зміни в таких параметрах, як температура, світло, вологість повітря та концентрація гормонів рослин можуть негативно вплинути на рослини. Наприклад, зміни температури або рівня освітлення можуть уповільнити ріст рослин, знизити ефективність розмноження та призвести до смерті [16, 15].

Правильний вибір експланту відіграє особливу роль, оскільки якість юанського матеріалу залежить від подальшої ефективності вирощування. Помилки або ненасильство з безпліддям під час етапу вибору обміну можуть призвести до забруднення та серйозний вплив на результат [11]. Крім того, оскільки цей процес визначає рівень виживання після проникнення в парниковий або відкритий ґрунт, ключовим етапом є коріння рослини.

Адаптація рослин до умов екзовіро — ще одна важлива стадія, оскільки вони можуть бути дуже чутливими до змін у станах навколишнього середовища, таких як температура, вологість та світло. Ця поступова зміна умов допомагає рослинам адаптуватися до нових параметрів і продовжувати нормальний розвиток в теплицях або відкритих ґрунтах [15].

Для досягнення хороших результатів та отримання здорового, генетично ідентичних рослин, які можуть бути використані для репродуктивних або

комерційних цілей слід ретельно контролювати все на кожному етапі процесу. Лише для постійних вдосконалень точності, досвіду та умови вирощування бажаний результат може призвести до відтворення мікротамору [12].

Лише за умов безперервного удосконалення технологій, досвіду персоналу та нагляду за факторами середовища можливо досягти стабільного та ефективного мікроклонального розмноження, особливо для видів з делікатними біологічними рисами, таких як орхідеї роду *Vanda* [13, 16]. Високоякісне забезпечення процесу — віддобророслинного матеріалу до етапу адаптації — є запорукою генетичної стабільності, відсутності контамінації та комерційної життєздатності здобутих рослин [15].

### **1.2.1. Отримання безвірусного посадкового матеріалу орхідеї Ванда.**

Орхідеї роду *Vanda* вирізняються особливою декоративністю, тому їх часто розмножують мікроклональним способом для подальшого вирощування в умовах теплиць або колекційного квітництва. Проте під час такого розмноження важливо отримати не просто рослину, а саме здоровий — безвірусний — посадковий матеріал. Це пов'язано з тим, що багато вірусів передається саме через вегетативне розмноження, особливо в умовах культивування тканин *in vitro* [14].

**До найпоширеніших вірусів, які вражають орхідеї (в тому числі *Vanda*), належать Основні віруси, що вражають орхідеї Ванда, є:**

*Cymbidium orchid virus* (CymMV) - викликає мозаїчну плямистість на листках, що знижує декоративність рослини.

Вірус кільцевої плямистості одонтоглосума (ORSV) – викликає появу кільцевих плям на листках, що також може негативно вплинути на зовнішній вигляд рослини.

Вірус тютюнової мозаїки (TMV) – хоча рідше зустрічається в орхідей, інфекція може завдати серйозної шкоди.

Ці віруси переважно передаються шляхом вегетативного розмноження, зокрема через механічні пошкодження або під час мікроклонального

розмноження *in vitro*. Патогени вірусів знижують декоративну цінність рослин і негативно впливають на їхній ріст [13].

**Щоб отримати безвірусні рослини, застосовують комплекс біотехнологічних методів:**

1. Культура меристем є, безумовно, найкращим підходом до порятунку рослин від вірусних, бактеріальних і грибкових інфекцій шляхом мікроклонального розмноження декоративних культур, особливо таких орхідей, як *Vanda* [18]. Техніка спирається на активну регенеративну здатність наймолодших клітинних ділянок або апікальних зон рослини, за допомогою чого вона ізолює ці клітини та вирощує їх далі в лабораторії в контрольованих умовах на стерильних поживних середовищах.

Меристемна тканина демонструє високу мітотичну активність без судинної провідної системи; таким чином, віруси не заражають їх легко. Ця властивість робить їх придатними для отримання безвірусного посадкового матеріалу [19]. Для надзвичайно цінних і високоякісних комерційних декоративних культур, таких як орхідеї, що належать до роду *Vanda*, фітосанітарна чистота є пріоритетом для розплідників і колекціонерів.

**Культивування меристем включає наступні етапи:**

1) Вибір рослини-донора. Вибирають морфологічну материнську рослину з найменш видимими ознаками вірусного ураження, якщо це можливо. Це має вирішальне значення, оскільки віруси-носії також можна знайти в рослинах, які не виявляють симптомів [20].

2) Меристемна ізоляція. Розмір приблизно 0,1-0,5 мм, зріз роблять під мікроскопом у стерильних умовах. Зазвичай це апікальна або брунькова меристема. Цю операцію необхідно виконувати дуже обережно, оскільки від розміру та ступеня очищення меристеми залежить подальше збереження тканини *in vitro*.

3) Культивування на живильному середовищі. Меристеми поміщають у змінене середовище Мурасіге та Скуга (MS) плюс додавання гормонів росту,

таких як цитокініни ВАР та ауксини НАА, які допомагають каллусу утворюватися та пускати нові пагони.

4) Етап регенерації. Диференціація та формування протокорму або проростка відбувається після розвитку каллусу. Потім їх можна перенести в середовище для вкорінення. Рослини виводяться у зовнішнє середовище після достатнього розвитку в процесі адаптації на стадії *ex vitro*.

5) Оцінка фітосанітарного стану. Акліматизовані рослини перевіряють на основні віруси за допомогою аналізу ELISA або ПЛР відповідно, щоб підтвердити відновлення отриманих рослин [21].

**До переваг культивування меристем слід віднести:**

- Вірусна санація: у понад 90% випадків рослини вільні від вірусів [19].
- Масове розмноження: отримані мікроклони зберігають генетичну ідентичність з материнською формою [18].
- Збереження рідкісних або зникаючих форм: Особливо важливо для збереження генетичного ресурсу орхідей [20].
- Можливість зберігання: меристеми можна зберігати в умовах кріоконсервації для подальшого використання [21].

Культура меристем стала основою біотехнологічного інструменту у виробництві орхідей у розплідниках, тобто способом поєднання високої якості, здоров'я рослин та комерційної ефективності. З появою технологій *in vitro* зараз настав час для масового знешкодження вірусних патогенів навіть у найменш стійких представників родини *Vanda* та подібних, зберігаючи їхню декоративну та біосистемну цінність [18, 21].

2. Термотерапія. Важливим етапом у процесі отримання безвірусного посадкового матеріалу є термотерапія – обробка материнської рослини підвищеною температурою для пригнічення активності вірусних частинок. Цей метод використовується перед виділенням меристеми, оскільки було показано, що теплова обробка значно знижує вірусне навантаження в тканинах рослин і, в деяких випадках, повністю знищує патогени [22].

Метод передбачає нагрівання рослини або її частин при 35-38°C протягом тривалого періоду 2-4 тижні в умовах контрольованої вологості та освітлення. Іноді використовуються триваліші курси лікування — до 6 тижнів — для досягнення більш ефективних результатів [16]. Тепличні умови або кліматичні камери підтримують стабільне середовище, яке допомагає зменшити активність вірусів, особливо тих, які не можуть розмножуватися за високих температур, таких як CymMV або ORSV [23].

Термотерапія застосовується не тільки до живих рослин, а й до саджанців, бруньок і експлантів, які ще не були відокремлені для культури *in vitro*. Це значно підвищує ефективність наступного етапу – культивування меристем.

Віруси рослин не мають власних терморегуляторних здібностей, тому їх білки і нуклеїнові кислоти нестійкі при температурі вище 35°C. Тривале нагрівання змінює структуру вірусного капсиду, пригнічує активність вірусної РНК або ДНК і перешкоджає подальшому розмноженню збудника в клітині [26]. Крім того, в умовах теплового стресу активується власна імунна відповідь рослини: підвищується концентрація захисних білків і ферментів (наприклад, пероксидаз), що сприяє локалізації інфекції.

Ефективність термотерапії підвищується, якщо її поєднувати з іншими методами: наприклад, гіпертермія + культура меристем + хіміотерапія (із застосуванням противірусних речовин). У дослідженні орхідей *Phalaenopsis* було продемонстровано, що після чотирьох тижнів гіпертермії в поєднанні з інкубацією з мікромерестетами розміром 0,2 мм 85% зразків, інфікованих CymMV, могли повністю одужати [24].

Інший популярний підхід до лікування поєднує термотерапію з кріотерапією (заморожування в рідкому азоті з наступним нагріванням), яка видаляє віруси з клітин без пошкодження меристеми [25].

**Але як і всі методи термотерапія має свої недоліки. До них слід віднести:**

- Фізіологічний стрес у рослин, якщо умови температури та вологості не підтримуються, може призвести до некрозу рослин або зниження здатності до регенерації.

- Тривалість цього процесу не завжди виправдана в промисловому виробництві.

- Видова специфіка: деякі види орхідей можуть бути більш чутливими до теплового стресу, тому метод необхідно адаптувати до конкретного генотипу.

3. Поєднання методів культивування *in vitro* із сучасними фітосанітарними заходами контролю має вирішальне значення для біотехнологічного розмноження орхідей роду *Vanda*. Головним етапом цього процесу є культивування меристем, наймолодших клітин рослини, які відомі своєю високою здатністю до регенерації та низькою сприйнятливістю до вірусної інфекції [19].

Меристеми культують на синтетичному поживному середовищі, зазвичай на середовищі Мурасіге та Скуга (MS), яке містить органічні матеріали, вітаміни, гормональні регулятори росту та збалансовану суміш макро- та мікроелементів [11]. У орхідей це середовище сприяє активному поділу клітин та зберігає життєздатність, що є критично важливим для формування протокорми та регенерації пагонів.

Необхідним кроком після успішного росту меристем та появи регенерантів є вірусна індексація, яка включає дослідження рослинного матеріалу на наявність вірусів. Це має вирішальне значення, оскільки одна заражена рослина може заразити всю партію. ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) та ІФА (імуноферментний аналіз) – це два надзвичайно чутливі діагностичні методи, що використовуються для цього [21].

Використовуючи антитіла, що містяться в комерційних тест-системах, метод ІФА дозволяє виявляти певні вірусні білки або антигени. Цей метод добре працює для скринінгу рослин у великих кількостях і може навіть виявляти латентні інфекції, які не мають жодних зовнішніх ознак [27]. Тому ПЛР є важливою для вірусної діагностики орхідей, оскільки вона пропонує дуже

високий ступінь точності та виявляє фрагменти вірусних нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) навіть у мізерних кількостях [21, 28].

Рослини будуть допущені до подальшої акліматизації та комерційного використання тільки після отримання негативних результатів діагностики основних відомих на даний момент вірусів, включаючи CymMV, ORSV, TMV та інші.

Таким чином, для того, щоб виростити здорові рослини *Vanda*, необхідно дотримуватись цілого комплексу заходів: використовувати мікромеристеми, попередньо обробляти рослину теплом та обов'язково перевіряти на віруси після вирощування. Це дозволяє отримати якісний, безпечний для подальшого використання посадковий матеріал.

### **1.3. Використання методу мікроклонального розмноження в промисловому квітникарстві**

Мікроклональне розмноження, яке також називають мікроклональним мікророзмноженням, визнано одним із найперспективніших методів квітників у сучасний час. Його ефективність часті вже підтверджена на великій площі вирощування прикрасних птахівників. Обрана ціль цього методу - отримати багато однорідного, здорового і високоякісного посадкового матеріалу, який зберігає цільову ознаку сорту: форму, забарвлення та аромат квітів, стійкість при захворюваннях, швидкість споживання та ін. [29].

Даний метод став особливо популярним в умовах зростання вимог до якості цього продукту в окремому вирощуванні квіткової культури. У клубниках, таких як *Phalaenopsis* та *Vanda*, мікроклональне розмноження перестало бути лише стандартом, а стало не посильним і стала частиною необхідності збереження стійких характеристик і швидкого обороту продуктів.

Основна ідея мікроклонального розмноження полягає у вирощуванні нових рослин з невеликого фрагмента донорської тканини (експланту), найчастіше — апікальної меристеми, пазушної бруньки чи квіткової тканини. Культивування здійснюється в умовах повної стерильності на штучних поживних

середовищах з додаванням гормонів росту. Вся процедура поділяється на кілька етапів:

- Ініціація культури — введення рослинного матеріалу у стерильні умови.
- Індукція проліферації — стимулювання клітин до поділу, утворення калюсу чи пагонів.
- Формування органів - розвиток пагонів чи протокормів (у разі орхідей).
- Укорінення - стимуляція утворення коренів.
- Акліматизація - привчання рослин до умов зовнішнього середовища [29].

### **Переваги мікророзмноження у квітникарстві:**

1) Рівномірне отримання матеріалу у великих масштабах. Однією з основних переваг мікророзмноження є здатність швидко виробляти величезну кількість рослин з ідентичними ознаками та характеристиками [29, 30]. Цікаво, що у більшості декоративних рослин (орхідей, глоксиній, хризантем, альстромерій, гвоздик) це також є переважним способом збереження сортових характеристик [32].

2) Фітосанітарна безпека. Мікроклонування за допомогою меристемної культури — це метод, який дозволяє створювати безвірусні рослини, оскільки меристема зазвичай безвірусна. Це дуже важливо для галузей, що використовують інтенсивні сільськогосподарські технології, де спалах з однієї партії може спричинити величезні економічні втрати [31].

3) Незалежність від сезону. Мікророзмноження в умовах *in vitro* відбувається в закритих місцях, які не залежать від погоди або часу року. Це дає виробникам можливість організувати цикли вирощування відповідно до ринковим потребам, зберігаючи постійну наявність продукту [31].

4) Збереження рідкісних видів. Метод має важливе значення у ботанічних садах та наукових місцях, бо допомагає зберігати і відновлювати популяції що зникають чи є рідкісними видами. Наприклад в Національному ботанічному саду України активно застосовуються методи *in vitro* для збереження рослин Карпат і Криму [33].

### ***Практичне застосування в квітникарстві.***

Орхідеї (фаленопсис і ванда). Це одна з найцінніших груп декоративних рослин. Вони відомі своєю різноманітністю форм, кольорів і ароматів. Мікроклональне розмноження є основним методом виробництва цих культур. Особливістю розмноження орхідеї Ванда є використання тканини квітконіжки, кінцевих бруньок і пазушних бруньок. Найвищу здатність до регенерації мають тканини над пагонами, культивовані в середовищі Murashige & Skoog, доповненому цитокінінами [30, 11]. Щороку з однієї материнської рослини можна отримати до 10 000 рослин.

Хризантема (*Chrysanthemum morifolium*). Це важлива культура для квітникарської галузі. Мікроклональне розмноження дозволяє зменшити витрати на захист рослин, підвищити врожайність високоякісної продукції та забезпечити стабільність ознак сорту[34].

Калла (*Alocasia lily*). Цей підхід використовується для боротьби з бактеріальними інфекціями та вірусними захворюваннями[35].

Гвоздики, лілії, нарциси, гербери. Для цих культур особливо важливо зберегти яскравість кольору, витримувати транспортування і довго стояти квіти у вазі [36].

Обмеження цього методу:

- Складність технології. Потрібні спеціалізовані лабораторії, дороге обладнання та кваліфікований персонал [31].
- Контроль стерильності. Навіть незначне забруднення навколишнього середовища може знищити цілу культуру [31].
- Сомаклональна мінливість. Під час процесів *in vitro* іноді спостерігаються генетичні аберації, що може призвести до втрати цінних ознак [32].

Мікроклональне розмноження є надзвичайно важливим інструментом у сучасному квітникарстві. Він забезпечує:

- стабільна якість продукції,
- масове виробництво рослин за короткий проміжок часу,
- безпека карантину рослин,

- ефективно зберігає сортові властивості.

З моменту впровадження цього методу промислове квітникарство вийшло на новий рівень, особливо виробництво орхідей, де кожна рослина має високу комерційну цінність. Очікується, що в найближчому майбутньому технології будуть вдосконалюватися, обладнання стане доступнішим, а різноманітність культур, які можна ефективно розмножувати *in vitro*, продовжуватиме розширюватися.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи

Дослідження проводилися протягом 2024–2025 років у лабораторії біотехнології рослин при кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Для якісного проведення біотехнологічних досліджень необхідно мати спеціально облаштовану лабораторію, яка включає ряд функціональних приміщень, оснащених відповідним обладнанням і засобами забезпечення стерильних умов.

#### **Оснащення лабораторії біотехнології рослин:**

1. Кімната для миття лабораторного посуду. Приміщення забезпечене підведенням холодної та гарячої води, а також джерелами очищеної води — дистильатором і бідистильатором. У кімнаті розміщені сушильні шафи, які працюють у температурному режимі 150–170 °С і призначені для стерилізації лабораторного посуду. Для зберігання стерильного інвентарю передбачені спеціальні закриті шафи.

2. Кімната для приготування поживних середовищ. Це лабораторне приміщення обладнане сучасними технічними, аналітичними, торсійними та демпферними вагами, що дозволяють точно відмірювати компоненти середовищ. Для контролю кислотності використовують рН-метри. У кімнаті також наявні холодильники для зберігання чутливих реактивів, електроплитки, водяні бані, витяжна шафа, лабораторні столи, центрифуга та термостати з регульованими умовами (температурою, вологістю). Приміщення оснащено також качалками (гойдальними установками) ролерного або шейкерного типу. Зберігання реактивів, живильного середовища та посуду здійснюється в спеціальних шафах.

3. Приміщення для стерилізації. Це кімната, у якій проводиться стерилізація поживних середовищ, інструментів і лабораторного посуду.

Обов'язковим елементом обладнання є система вентиляції, яка забезпечує безпечні умови для персоналу при роботі з високими температурами та паром.

4. Асептична (стерильна) кімната. Призначена для введення органів, тканин або частин рослин в умовах стерильності *in vitro*. У приміщенні встановлено ламінарні бокси, які створюють безконтактний стерильний простір. Підлога виготовлена з матеріалів, стійких до постійного впливу дезінфекційних засобів (кахель або лінолеум), що дозволяє проводити регулярну санітарну обробку. Для дезінфекції повітря в боксах використовують бактерицидні лампи типу ОБП-300, БУФ-15, БУФ-30 або їх іноземні аналоги.

5. Світлова культуральна кімната. У цьому приміщенні підтримуються чітко регульовані параметри мікроклімату: температура 25–27 °С, вологість 70–80 % та фотоперіод, який зазвичай становить 16 годин світла. Культури розміщуються на стелажах або полицях, де створені оптимальні умови для росту. Для забезпечення стабільного мікроклімату використовують кондиціонери відповідної потужності, які підбираються залежно від об'єму кімнати.

6. Темнова культуральна кімната. Призначена для вирощування калюсних тканин і клітинних суспензій, які потребують умов без доступу світла. У приміщенні підтримується температура в межах 25–26 °С, відносна вологість — 70–80 %.

Обладнання включає установки ротаційного та шейкерного типу, які забезпечують постійне перемішування середовища, необхідне для рівномірного росту суспензійних клітин.

7. Кімната для проведення цитологічних досліджень. Цитологічна лабораторія є важливою частиною біотехнологічного комплексу, оскільки саме тут здійснюється вивчення структурної організації клітин та тканин рослин, що культивуються *in vitro*. У даному приміщенні проводять дослідження процесів мітозу, морфогенезу, соматичного ембріогенезу, а також оцінюють цитогенетичну стабільність регенерантів.

Кімната цитологічних досліджень обладнана сучасними біологічними мікроскопами різного типу, зокрема:

- ✓ МБИ-3 — лабораторний мікроскоп зі змінними об'єктивами та широким діапазоном збільшення;
- ✓ МБИ-15 — мікроскоп із покращеною оптикою, що дозволяє здійснювати точні морфологічні спостереження клітин;
- ✓ МБС-9 — стереомікроскоп, який дає змогу вивчати тривимірну структуру досліджуваних об'єктів (наприклад, апікальних меристем, калюсів, мікропагонів).

Також у приміщенні знаходяться допоміжні інструменти для підготовки препаратів:

- покривні та предметні скельця;
  - мікронасадки та пінцети;
  - фарбувальні розчини для візуалізації клітинних структур (наприклад, ацетоцармін, ацеторезорцин, орсеїн);
- штативи, піпетки, ємності для зберігання реактивів.

Для підготовки постійних і тимчасових мікропрепаратів використовують спеціальні набори інструментів. У кімнаті підтримуються стабільні умови освітлення та температури, необхідні для роботи з оптикою, а також передбачено робочі місця для одночасної роботи кількох дослідників.

Усі отримані мікроскопічні зображення можуть фіксуватись за допомогою цифрових фотокамер або вбудованих систем відеофіксації, що дозволяє проводити детальну морфометричну обробку результатів за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення.

### **Посуд, інструменти та матеріали, що використовувались у дослідженні**

Для успішної роботи з рослинними тканинами та клітинними культурами необхідно забезпечити наявність відповідного лабораторного посуду, інструментів і витратних матеріалів. У нашій роботі використовували термостійкий посуд, зокрема:

- Колби з плоским дном різної місткості — 100, 250, 500 мл, а також 1, 2, 3 та 5 літрів — для приготування й зберігання живильних середовищ;

- Хімічні стакани об'ємом 50, 100, 250, 400, 800 мл та 1 л — для розчинення реактивів;

- Мірні циліндри на 25, 50, 100, 250, 500 мл, 1 та 2 л — для точного вимірювання рідин;

- Пеніцилінові флакони, пробірки, а також чашки Петрі (як скляні, так і пластикові) — для висіву та культивування рослинного матеріалу.

До основних інструментів, якими ми користувалися, належали:

- Піпетки Мора (1–10 мл), градуйовані піпетки (0,1–0,5 мл), автоматичні дозатори для точного перенесення рідин;

- Скляні конічні лійки, скляні палички різного діаметру — для перемішування та фільтрування;

- Фільтри мембранні “Синпор” із порами розміром 0,4 мкм — для тонкого очищення розчинів;

- Пастерівські піпетки, металеві пінцети, ножиці, ланцети — для виконання мікроманіпуляцій з експлантами.

Серед витратних матеріалів, які активно використовувалися у ході досліджень, були:

- Фільтрувальний, обгортковий та пергаментний папір;
- Марля, вата, ватні пробки;
- Алюмінієва фольга — для герметичного накривання посуду.

Проведення досліджень. Усі маніпуляції, пов'язані з введенням рослинного матеріалу в культуру *in vitro* та подальшими пересадками, виконувались в асептичних умовах. Для цього використовували ламінарно-потоківі бокси, які попередньо дезінфікували за допомогою ультрафіолетового опромінення протягом щонайменше 30 хвилин. До обробки ламінару також входило протирання спиртом (96 % етиловим) усіх поверхонь.

Руки стерилізували 96° етиловим спиртом, а інструменти — за наступною схемою: спочатку поміщали у фарфоровий стакан зі спиртом, після чого прожарювали в полум'ї спиртівки. Перед використанням інструмент залишали на стерильній підставці для охолодження. Кожен інструмент використовували

лише для однієї маніпуляції, а у разі повторного застосування обов'язково проходив повторну стерилізацію.

Живильні середовища стерилізували в автоклаві при тиску 1–2 атмосфери протягом 20–25 хвилин. Лабораторний посуд перед використанням обробляли у сушильній шафі, де підтримувалася температура 160–180 °С, час витримки складав 2–2,5 години.

Таким чином, дотримання всіх умов стерильності було надзвичайно важливим етапом для успішного проведення біотехнологічних досліджень.

## **2.2. Матеріали досліджень**

У даній роботі в якості вихідного матеріалу використовували верхівкові пагони орхідеї *Vanda*, а також листові експлантати, які мали повітряні корені та частково сформований калюс. Орхідеї роду *Vanda* належать до епіфітних рослин, які природно ростуть на деревах у тропічних і субтропічних регіонах. Вони вирізняються добре розвиненою повітряною кореневою системою, яка активно бере участь у фотосинтезі та водопоглинанні з повітря. Особливістю цієї орхідеї є здатність швидко реагувати на зміну умов середовища, що важливо враховувати при мікроклональному розмноженні.

Перед стерилізацією листові експлантати розрізали на частини завдовжки приблизно 2–3 см. Це робило процедуру стерилізації ефективнішою і зручнішою, адже зменшення розміру фрагментів дозволяє рівномірніше обробити тканину антисептичними розчинами та знижує ризик внутрішнього інфікування. Такий підхід дає змогу отримати якісний стерильний матеріал для подальшого культивування *in vitro*.

## **2.3. Методи досліджень**

В ході дослідження були використані стандартні методи, що є загальноприйнятими у практиці біотехнологічних досліджень.

Під час виконання роботи ми займалися дослідженням процесів морфогенезу та розмноження орхідеї *Vanda*, які охоплювали кілька основних напрямків. Насамперед це була оцінка здатності рослин утворювати калюсну

тканину, далі — вивчення формування пагонів у стерильних умовах *in vitro*, особливості процесу ризогенезу (тобто утворення коренів), а також укорінення отриманих рослин-регенерантів і їх поступова адаптація до звичайного середовища (*in vivo*).

Щоб отримати калюс, використовували різні типи вихідного матеріалу: листові експлантати, частини повітряних коренів і вже наявні калюсні утворення. Перед культивуванням усі ці частини проходили ретельну стерилізацію, а потім переносилися на спеціально підібране поживне середовище. Особливу увагу приділили апікальним меристемам із дрібними листовими примордіями розміром близько 0,3–0,5 мм. Саме ці мікромеристеми вважаються найбільш перспективними для оздоровлення, адже вони практично не заражуються вірусами.

На етапі пагоноутворення працювали з верхівковими частинами пагонів та мікрочеренками довжиною 1–2 см з парою листків та частиною повітряних коренів. Саме в цих частинах знаходяться меристематичні тканини, які здатні утворювати нові пагони. Завдяки правильному підбору фітогормонів, зокрема поєднанню цитокінінів і ауксинів, вдалося досягти гарних результатів — з одного експлантата виростало кілька нових рослин.

Далі перейшли до одного з найважливіших етапів — стимулювання ризогенезу, тобто утворення коренів. Саме добре сформована коренева система забезпечує виживання рослини після пересадки у звичайне середовище. Для цього пагони-регенеранти переносилися на середовище зі зниженим вмістом макроелементів, доповнене ауксинами — частіше за все застосовували індолілоцтову (ІОК) та індолілмасляну (ІМК) кислоти в концентраціях 0,5–2,0 мг/л. Такі умови сприяли утворенню кореневих зачатків уже протягом перших двох тижнів.

Особливістю орхідей *Vanda* є те, що вони утворюють повітряні корені, які вкриті веламеном — спеціальною тканиною, що вбирає вологу з повітря і бере участь у фотосинтезі. Тому для успішного ризогенезу важливо не тільки підібрати правильне середовище, а й забезпечити доступ до кисню та світла. Я

помітила, що найкраще корені розвиваються при розсіяному денному або штучному білому освітленні інтенсивністю 2000–3000 лк.

На завершальному етапі проводили адаптацію рослин до умов *in vivo* — це важлива частина роботи, адже від того, як рослина перенесе перехід із лабораторії в ґрунт, залежить її подальший розвиток. Спочатку рослини пересаджувались у вологий, добре дренований субстрат і накривались для створення умов високої вологості. Поступово накриття знімали, щоб рослина звикала до зовнішнього середовища. Температуру підтримувала в межах 23–25 °С, а полив проводили обережно — лише після просихання верхнього шару субстрату.

### **2.3.1. Стерилізація експлантатів орхідеї Ванда та умови культивування рослин**

Для досліджень з культури ізольованих тканин орхідей *Vanda* ми використовували листові експлантати, частини повітряних коренів, верхівкові пагони та калюсні утворення, які були відібрані зі здорових рослин-донорів. Перед введенням у стерильну культуру важливо було якісно провести етап стерилізації, щоб уникнути зараження грибами чи бактеріями в процесі подальшого культивування.

Перш за все експлантати ретельно промивались у мильному розчині протягом 10–15 хвилин для видалення поверхневих забруднень. Після цього їх промивали проточною водою, далі — дистильованою водою, а на завершення — двічі стерильною дистильованою водою. Усі наступні дії виконувались виключно в умовах ламінарного боксу з дотриманням правил асептики.

Для оптимізації процесу стерилізації я випробовувала декілька варіантів із використанням різних стериліантів і тривалістю їхньої дії. Зокрема, як стерилізувальні агенти застосовувались:

- ✓ 70% етиловий спирт (експозиція 30–60 секунд),
- ✓ 0,1% розчин сулеми ( $\text{HgCl}_2$ ) — експозиція 5–8 хв,
- ✓ 0,08% розчин нітрату срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) — експозиція 4–6 хв,

- ✓ 0,1% розчин натрію гіпохлориту (NaOCl), доповнений кількома краплями Твін-20 — експозиція 8–10 хв.

Після кожної обробки стериліантом матеріал кілька разів промивали стерильною дистильованою водою (по 3–5 хв кожне промивання), щоб уникнути токсичного впливу залишків реагентів на живі клітини.

Для культивування в умовах *in vitro* експлантати розміщували на агаризоване поживне середовище типу MS [11] з додаванням 0,25 мг кінетину, сахарози (30 г/л), агар-агару (6–8 г/л), регуляторів росту (цитокінінів та ауксинів — залежно від стадії), а рН середовища коригували до 5,6–5,8 перед автоклавуванням.

Температурні умови культивування становили 24–26 °С у режимі 16-годинного освітлення (освітленість 2000–3000 лк) та 8 годин темряви. Для укорінення і калусоутворення використовували окремі варіанти середовищ зі зниженим вмістом мінеральних речовин і підвищеним рівнем ауксинів (ІОК, ІМК або НАА). В таблиці 2.1. вказано два варіанти 2.1.

Таблиця 2.1.

### Варіанти стерилізації експлантатів орхідеї *Vanda*

№ варіанта	Стерилізувальний агент	Експозиція (хв)	Особливості обробки і висновок
1	70% етилового спирту + 0,1% розчин Сулеми	0,5 + 5	Найбільш підходяща схема для ефективного пагоноутворення
2	0,08% AgNO <sub>3</sub> + 0,1% NaOCl	6 + 10	Ефективна схема для стерилізації листових експлантатів

Використання комбінованих схем стерилізації дало можливість отримати чисті культури з високим рівнем приживлюваності, що надалі забезпечувало успішне формування калюсу, пагонів і коренів.

Стерильні експлантати орхідей роду *Vanda* тричі, з інтервалом у 10 хвилин, промивали стерильною дистильованою водою. Після цього їх поміщали в чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір для обсушування. З допомогою стерильного пінцету експлантати переносили, дотримуючись правил стерильності, у пробірки з безгормональним живильним середовищем МС1 для адаптації. Склад живильного середовища представлено у таблиці 2.2 [2].

Таблиця 2.2

**Склад безгормонального ЖС для культивування експлантатів  
Орхідеї Ванда (МС+0,25К)**

Компоненти	Кількість
Макро МС	50 мл
Мікро МС	0,5 мл
Fe – хелат	2,5 мл
Вітаміни по МС	0,5 мл
Кінетин	0,25 мг
Сахароза	10 г
Агар	3 г
1 н КОН	5 кр

Примітка: рН 5,6-5,8

Пробірки з експлантатами культивували у термостаті без доступу світла за температури  $25 \pm 1$  °С. Через 7 діб з моменту закладки перевіряли їх на наявність мікробіологічного обсіменіння. У випадку виявлення інфікованих зразків їх вилучали з термостату, оскільки вони були джерелом інфекції [15]. Ефективність стерилізації ( $E_c$ ), у відсотках, обраховували за формулою: Ефективність стерилізації ( $E_c$ ) визначали у відсотках за формулою:

$$E_c = ((K_e - K_{вре}) / K_e) \times 100, \text{ де:}$$

$K_e$  – загальна кількість висаджених експлантатів, шт.;

$K_{вре}$  – кількість уражених (інфікованих) експлантатів, шт.

### 2.3.2. Підбір живильних середовищ для культивування ізольованих тканин орхідеї Ванда

Головною умовою успішного калусогенезу та регенерації рослин є правильно підібраний склад живильного середовища. Для орхідей роду *Vanda* у наших дослідженнях було використано живильне середовище Мурасіге і Скуга у нашій модифікації (МС) [11], склад якого представлений у таблиці 2.3. До середовища було додано регулятори росту рослин: 6-бензиламінінопурен (БАП) у концентрації 1,0 мг/л та нафтилоцтову кислоту (НОК) у концентрації 0,5 мг/л. У колонці, вказаній для стимуляції морфогенезу, до середовища додавали кінетин у концентрації 0,25 мг/л, який відповідно до робіт [5, 18] сприяє утворенню калюсу та ініціації проростання бруньок.

Таблиця 2.3.

#### Склад живильного середовища Мурасіге-Скуга.

Компоненти	Концентрація (мг/л)
<b>Макроелементи:</b> $\text{NH}_4\text{NO}_3$	850 (зменшено наполовину)
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<b>Мікроелементи:</b> $\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KI	0,83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
<b>Вітаміни:</b> Тіамін ( $\text{B}_1$ )	0,5

Піридоксин (В <sub>6</sub> )	0,5
Нікотинова кислота (РР)	0,5
Мезоінозитол	100
Регулятори росту: 6-БАП	1,0
NAA	0,5
2,4-D	1,0
<b>Інші компоненти:</b> Сахароза	30 000
Агар-агар	7000–8000
Активоване вугілля (опційно)	1000

Примітка: рН 5,7–5,8

### **2.3.3.Отримання калюсу із різних експлантатів орхідеї Ванда та непрямий морфогенез**

Одним з ключевих етапів мікроклонального розмноження будь-якого виду рослин є отримання калюсу – недиференційованої маси клітин, що виникає у відповідь на фітогормональні сигнали у експлантаті. Калюсогенез дає можливість отримати нову рослину через неопосередковані стадії морфогенезу - органогенез чи соматична ембріогенеза [5, 10, 18].

В процесі наших досліджень калюс з орхідеї Vanda було отримано з різних типів експлантатів – фрагментів листків, кінчиків коренів та базальної частини пагонів, що були заздалегідь акліматизовані на безгормональному середовищі МС1. Подальше такі експлантати переносили на модифіковане середовище на основі Мурасіге і Скуга із додаванням 2,4 дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4 Д) у концентрації 0,5; 1,0 та 2,0 мг/л із додаванням цитокінінів – 6 бензиламінопурину (БАП) або кінетину (0,25–0,5 мг/л) [10, 14, 30].

Калусна тканина починала формуватися на 2–3-й тиждень культивування. Максимальний індекс калюсоутворення було зареєстровано на середовищі із комбінацією 2,0 мг/л 2,4 Д та 0,5 мг/л БАП із базальних фрагментів пагона. Калюс був кремово білим або жовтуватим, м'яким або компактним – в залежності від типу експлантата та складу середовища.

Всі культивування виконували у термостаті за температури  $25 \pm 1$  С у темноті. З метою уникнення фізіологічного старіння тканин калюс регулярно переносили на свіже середовище із тим самим складом кожні 4–5 тижнів [2, 12].

Після кількох пасажів частину калюсу перенесли на середовище зі зниженим вмістом ауксину або взагалі без нього, але з додаванням БАП чи кінетину. У таких умовах калюс починав зеленіти, і на його поверхні з'являлися маленькі зелені горбики, які слугували зачатками нових пагонів. Це свідчило про початок процесу непрямого морфогенезу, тобто формування нової рослини з калюсу [10, 18, 21].

Найкращі результати досягались при збалансованому співвідношенні ауксинів і цитокінінів. Якщо ж ауксинів було надто багато, то пагони не утворювалися — тканина залишалася у стані калюсу. Таким чином, для успішного відновлення рослин необхідно ретельно підбирати склад середовища залежно від мети — створення калюсу чи стимуляції регенерації [20, 29].

Таблиця 2.4

**Склад живильного середовища для культивування калюсних тканин орхідеї Ванда**

<b>Компоненти</b>	<b>МСВ1</b>	<b>МСВ2</b>	<b>МСВ3</b>
МС-макро, мл	100	100	100
МС-мікро, мл	1,0	1,0	1,0
Fe-хелат, мл	5,0	5,0	5,0
m-Інозит, мг	100	100	100
Сахароза, г	30	30	30
Гідролізат казеїну, мг	500	500	500
6-БАП, мг/л	0,5	1,0	2,0
2,4-D, мг/л	1,0	1,5	2,0
Вітаміни за МС, мл	1,0	1,0	1,0
Агар, %	0,7	0,7	0,7

Примітка: рН 5,7–5,8

Для субкультивування калюсної тканини орхідеї *Vanda* середня маса сирії речовини становила  $2,0 \pm 0,10$  г. Тривалість одного циклу культивування складала 28–30 діб. Культуру вирощували у пеніцилінових флаконах об'ємом 40 мл, які тримали у термостаті ТС-80 за температури  $25 \pm 1$  °С у повній темряві. Вологість повітря підтримувалася на рівні 70–75 %.

Частота формування калюсу визначалась у відсотковому відношенні кількості експлантатів, які успішно сформували калюс, до загальної кількості зразків. Середньомісячний приріст сирії маси калюсу розраховували як різницю між масою після завершення культивування і початковою масою, що поміщалась на середовище, відповідно до методики, описаної Логіновим (2021).

Для індукції непрямого морфогенезу калюсну тканину *Vanda* із середньою масою  $2,0 \pm 0,10$  г пересаджували на живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС), збагачене фітогормонами. Для дослідження використовували такі варіанти:

- 6-бензиламінопурин (БАП) у концентрації 0,1–3,0 мг/л;
- кінетин у концентрації від 0,5 до 2,0 мг/л;
- 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д) у межах 0,1–1,0 мг/л.

Культивування проводилось у контрольованих умовах при температурі  $25 \pm 1$  °С, освітленні на рівні 2,0–3,0 тисяч лк, фотоперіоді 16 годин світла та 8 годин темряви, а також за відносної вологості 70–75 %.

#### **2.3.4.Отримання прямого морфогенезу та укорінення рослин орхідеї Ванда**

З метою стимулювання прямого морфогенезу в орхідеї *Vanda*, для культивування використовували модифіковане живильне середовище МСА, збагачене вітамінами за Уайтом та 6-бензиламінопурином (БАП) у концентрації 0,5 мг/л. Застосування цього середовища дало можливість отримати формування пагонів без проходження калюсної фази, що значно прискорювало процес регенерації.

Після утворення мікропагонів, їх переносили на середовище МСР, спеціально призначене для укорінення. У складі цього середовища

використовували знижений вміст цукру та додавання ауксину ІМК (0,5 мг/л), що сприяло формуванню повноцінної кореневої системи.

Склад живильних середовищ, які застосовувалися для пагоноутворення і укорінення, представлено в таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

**Склад живильного середовища для пагоноутворення (МСА) та  
ризогенезу (МСР) орхідеї Vanda**

<b>Компонент</b>	<b>МСА</b>	<b>МСР</b>
Макроелементи за МС, мл	100	100
Мікроелементи за МС, мл	1	1
Fe-хелат, мл	5	5
Вітаміни за Уайтом, мл	1	1
Міо-інозит, мг	100	100
Сахароза, г	30	20
БАП, мг/л	0,5	—
Індолілмасляна кислота (ІМК), мг/л	—	0,5
Агар, %	0,7	0,7

Примітка: рН 5,7–5,8

### **2.3.5. Адаптація рослин-регенерантів *Orchidaceae vanda***

Рослини Ванди з добре розвиненою кореневою системою та щільним зеленим листям вилучали з живильного середовища для подальшої акліматизації в тепличних умовах.

Щоб допомогти рослинам краще адаптуватися до нестерильного середовища, відкрийте культуральний контейнер і додали 2-3 мл стерильної

дистильованої води, щоб зволожити культуральне середовище і запобігти його висиханню. У такому вигляді витримали дві доби. Після цього обережно видалили рослини, змили залишки агаризованого середовища під проточною водою і продезінфікували розведеним (близько 1%) розчином перманганату калію або основним спиртом, щоб запобігти можливим захворюванням.

Середовище для пересадки складається з соснової кори, моху сфагнуму і перліту в співвідношенні 2:1:1. Його попередньо стерилізували в автоклаві при 1,5–2 атм за методикою Калініна та ін.

Після посадки накрили рослини прозорим покриттям, наприклад, пластиком або склом, щоб зберегти вологу і створити мікроклімат. Температура тримається в діапазоні 24-26°C, а вологість близько 85-90%.

Через 10 днів після посадки проводили першу підгодівлю розведеним (наполовину) розчином солі за методом Мурасіге і Скуга (МС).

Ще через два тижні почали поступово знімати пластик, щоб дозволити рослинам звикнути до тепличних умов. Спочатку це було лише кілька годин на день, поступово збільшуючи кількість часу, коли рослини були відкриті. Через тиждень повністю зніміть плівку і пересадили рослину в більший контейнер або підвісний горщик з епіфітним субстратом для орхідеї.

Після завершення акліматизації рослини оцінювали на виживання *in vivo*. У середньому виживаність рослин орхідеї Ванда після пересадки *in vitro* становить близько 85-90%.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Введення в культуру *in vitro* та отримання асептичних експлантатів орхідеї Ванда

У ході нашого дослідження було проведено низку експериментів для отримання асептичної культури орхідеї *Vanda*. Рослини утримували у воді, після чого їх доставляли до лабораторії, де ретельно промивали під проточною водою, щоб видалити забруднення з поверхні стебел і листя. Для запобігання мікробній контамінації подальша стерилізація проводилася в ламінарному боксі.

Для підвищення ефективності стерилізації було використано два методи обробки експлантатів із різною тривалістю дії стерилізуючих розчинів.

Стерилізація первинного рослинного матеріалу орхідей виду *Vanda* здійснювалася шляхом послідовної обробки експлантатів у кількох стерилізуючих розчинах, із різною тривалістю кожної стадії. Такий поетапний підхід дозволив ефективно усунути як поверхневу, так і внутрішню (ендогенну) мікрофлору.

Обробка експлантатів проводилася за наступним алгоритмом:

#### **Варіант 1: Використання «Famosept»**

- ✓ 70% етиловий спирт — обробка протягом 1 хвилини.
- ✓ 1% розчин «Famosept» — занурення на 15 хвилин.
- ✓ 15% розчин перекису водню — обробка протягом 15 хвилин.
- ✓ 10% розчин «Chlorox» — занурення на 20 хвилин.

Після кожного етапу експлантати промивали тричі стерильною дистильованою водою. Усі процедури виконували в ламінарному боксі з дотриманням правил асептики.

**Результат:** Даний метод виявився менш ефективним — на 7-му добу культивування інфікованих експлантатів було до 12%, а на 10-ту добу цей показник зріс до 16%.

#### **Варіант 2: Використання 0,1% розчину діациду**

- ✓ 70% етиловий спирт — обробка протягом 1 хвилини.
- ✓ 0,1% розчин діациду — занурення на 20 хвилин.

- ✓ 15% розчин перекису водню — обробка протягом 15 хвилин.
- ✓ 10% розчин «Chlorox» — занурення на 20 хвилин.

Після кожного етапу експлантати ретельно промивали тричі стерильною дистильованою водою. Усі процедури виконували в ламінарному боксі з суворим дотриманням правил асептики.

**Результат:** Обраний метод демонстрував високу ефективність стерилізації — на 7-й і 10-й день культивування частка інфікованих експлантатів становила лише 2%. Це свідчить про успішне усунення як поверхневої мікрофлори, так і ендогенної.

Для експерименту використовували верхівкові частини пагонів та вузлові сегменти. Після стерилізації ці частини розрізали на менші фрагменти розміром 1,0–1,5 см. Дрібні частинки надалі культивували на безгормональному живильному середовищі Мурасіге і Скуга (MS).

Отримані результати показали, що ефективність стерилізації залежала від концентрації та тривалості дії стерилізуючих агентів. Найкращий результат досягався при застосуванні 0,1% розчину діациду у поєднанні з перекисом водню та «Chlorox». Це дозволяло повністю знищити екзогенну та ендогенну мікрофлору в рослинному матеріалі.

Стан стерильності експлантатів оцінювали на третій і сьомий день перебування в умовах *in vitro*. Згідно з даними, представленими в таблиці 3.1, використання діациду забезпечило високий рівень ефективності стерилізації — до 98–100% для особин родини *Vanda* на сьому добу культивування.

Таблиця 3.1

**Ефективність стерилізації експлантатів орхідеї за різних схем асептичної обробки**

Рослина	Кількість експлантатів	Кількість інфікованих експлантатів на 7 добу, %	Кількість інфікованих експлантатів на 10 добу, %

		Варіант			
		1	2	1	2
Orchidaceae	50	12	2	16	-
Vanda					
HIP 05		2,84	0,2	4,55	

Після проведення успішної стерилізації та отримання асептичних експлантатів орхідеї Vanda на 10 добу культивування, стерильний рослинний матеріал поміщали у культуральні банки з живильним середовищем Мурасіге і Скуга (MS), доповненим фітогормонами для індукції калусоутворення та отримання рослин-регенерантів.

На першу–другу добу культивування стерильних експлантатів Vanda спостерігалось незначне набухання тканин і збільшення їх розміру, що свідчило про початок активного метаболізму та пристосування до умов *in vitro* (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Стерильний експлантат Orchidaceae Vanda

Обидва підходи передбачали попередню обробку 70% етиловим спиртом, подальше застосування перекису водню (15%) і «Chlorox» (10%). Визначальною відмінністю між схемами був другий етап: використовувався або Famosept, або діацид.

В результаті найефективнішою виявилася схема з діацидом, яка забезпечила повне видалення як зовнішньої, так і ендогенної мікрофлори. Це дозволяє рекомендувати саме цей метод для отримання асептичної культури орхідей *Vanda* в умовах *in vitro*.

### **3.2. Особливості калюсогенезу орхідей роду Ванда**

Калюсною тканиною у вищих рослин називають тканину, що утворюється через неконтрольовану проліферацію клітин в експлантатах після їх першого субкультивування. Цей процес широко застосовується в біотехнологічних дослідженнях, а також у мікроклональному розмноженні рослин. За спостереженнями відомого ботаніка Н. Кренке, калюсна тканина проходить кілька стадій, включаючи активне ділення клітин для захисту ушкодженої ділянки, акумуляцію поживних речовин і можливу регенерацію органів, втрачених у результаті пошкодження. Проте, при тривалому культивуванні можливе виникнення цитогенетичних змін, що спричиняє зниження або повну втрату морфогенетичного потенціалу калюсу.

Дослідження показали, що процес калюсогенезу у рослин *in vitro* значною мірою залежить від зовнішніх умов. Найважливішим фактором є склад живильного середовища, зокрема присутність регуляторів росту. Ефективна індукція калюсу зазвичай спостерігається за використання класичного співвідношення ауксинів до цитокінінів 10:1.

Регулятори росту відіграють ключову роль у стимуляції проліферації клітин і структурних змін у тканинах, що забезпечує формування калюсної маси з високим потенціалом для подальшої регенерації.

У орхідей роду *Vanda* калюс зазвичай отримують із меристемних або листових експлантатів шляхом культивування їх на спеціально модифікованому

живильному середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням регуляторів росту. До таких регуляторів входять, зокрема,  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота (НОК) і 6-бензиламінопурин (БАП) у різних концентраціях. Для індукції калюсу використовували наступну серію живильних середовищ (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

### Вміст регуляторів росту у калюсогенних середовищах

Варіант	Регулятори росту
1	0,2 мг/л НОК + 2 мг/л БАП
2	0,5 мг/л НОК + 2 мг/л БАП
3	1 мг/л НОК + 2 мг/л БАП

Для індукції калюсу експлантати поміщали у стерильні флакони з живильним середовищем та вирощували їх у темряві за температури  $+25 \pm 1$  °С протягом 14 днів. Далі їх переносили у світловий режим (фотоперіод – 16 годин, освітлення – 3000 лк) за температури  $+24 \pm 1$  °С. На 30-тий день після закладки проводили облік частоти утворення калюсу та його біомаси (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

### Залежність калюсогенезу орхідей роду *Vanda* від вмісту регуляторів росту у живильному середовищі

Варіант	Склад ЖС	Кількість експлантатів, шт	Кількість експлантатів, що утворили калюс, шт	
			% Калюсоутворення	Маса калюсу, мг
1	МС + 0,2 мг/л НОК + 2 мг/л БАП	40	90%	270 $\pm$ 15,8
2	МС + 0,5 мг/л НОК + 2 мг/л БАП	40	97,5%	540 $\pm$ 24,3
3	МС + 1 мг/л НОК + 2 мг/л БАП	40	100%	690 $\pm$ 30,2

Найвища маса калюсної тканини і максимальний відсоток утворення калюсу були зафіксовані в середовищі варіанту 3, де концентрація НОК становила 1 мг/л.



Рис. 3.2. Калюсна тканина орхідеї Ванда

Крім кількісних характеристик також оцінювали щільність і забарвлення калюсної маси. У орхідей роду *Vanda* калюс зазвичай мав кремово-біле або жовтувате забарвлення, був пухкої чи середньої щільності з вираженою меристематичною активністю, яка свідчить про високий регенераційний потенціал тканини.

### 3.3. Особливості непрямого морфогенезу орхідей роду *Vanda*

Одним із найменш досліджених аспектів клітинної диференціації є морфогенез. Основна складність у вивченні фізіологічних, біохімічних і молекулярних процесів, що лежать в його основі, полягає в асинхронності диференціації клітин у тканинах, які згодом утворюють органи. Осередки морфогенезу просторово розмежовані, а клітини, що беруть участь у цьому процесі, мають різний рівень метаболічної активності. Під час культивування неорганізованих калюсних тканин виникають різноманітні морфологічні структури, які зрештою формують пагони, корені, листки, а в певних випадках — і цілі рослини.

Непрямий морфогенез у орхідей роду *Vanda* зазвичай охоплює два основних етапи: спершу з експлантату формується калюсна тканина, а далі в калюсі розвиваються морфогенні структури (органогенез або соматичний

ембріогенез). Поява органів у калюсній культурі пов'язана зі співвідношенням фітогормонів. Зокрема, оптимальним для органогенезу є відношення цитокінінів до ауксинів як 10:1. Водночас перевага ауксинів може сприяти ініціації ембріогенезу або коренеутворення.

Калюсні культури *Vanda* демонструють здатність до як соматичного ембріогенезу, так і органогенезу — з утворенням пагонів, коренів та навіть флоральних елементів. Така пластичність робить цей рід перспективним для масштабного мікроклонального розмноження. Водночас здатність до органогенезу є вищою у тканинах, ближчих до основи рослини, тоді як ізоляція від стебла знижує морфогенну активність. Крім того, багаторазові пасажування калюсних культур поступово призводять до зниження здатності утворювати нові органи, хоча коренеутворення може залишатися стабільним протягом тривалішого часу.

Для стимуляції непрямого морфогенезу калюсні тканини масою  $2,0 \pm 0,10$  г культивували на модифікованому живильному середовищі Мурасіге та Скуга з додаванням гормонів: 6-бензиламінопурину (БАП), кінетину та 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) у різних концентраціях. Умови культивування включали температуру  $25 \pm 1$  °С, освітленість 2,0–3,0 тис. лк при 16-годинному фотоперіоді та вологість повітря 70–75 %. У ході наших досліджень було зафіксовано активний процес органогенезу для обох досліджуваних сортів гвоздики (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

#### Потенціал органогенезу в умовах *in vitro* у різних сортів гвоздики

№ п/п	Рослина	Інтенсивність органогенезу		
		Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт	Висота пагонів, см
1	Orchidaceae <i>Vanda</i>	100 (на 2–3 пасажах)	$4,0 \pm 0,25$	$7,50 \pm 0,10$

2	Orchidaceae Vanda	52,30 (на 5-6 пасажах)	$2,1 \pm 0,18$	$5,20 \pm 0,14$
3	Orchidaceae Vanda	12,75 (на 7-8 пасажах)	$0,4 \pm 0,07$	$2,10 \pm 0,09$

За результатами досліджень встановлено, що найбільш інтенсивний органогенез спостерігається на 2–3 пасажах. Проте з подальшим збільшенням кількості пасажувань (понад 5–6) активність формування пагонів суттєво знижувалась і майже припинялася після 8–9 пасажу. Причиною цього явища може бути соматональна мінливість — генетичні або епігенетичні зміни, зумовлені тривалим культивуванням.



Рис.3.5. Утворення пагонів: 1- тривалість культивування калюсних тканин Orchidaceae Vanda становила 4 пасажі; 2 - 2 пасажі; 3- 6 пасажів.

Таким чином, ефективність непрямого морфогенезу у Vanda залежить від кількох факторів: генотипу донорської рослини, положення експлантату, гормонального складу середовища та кількості пасажувань. Для забезпечення високої морфогенної активності рекомендується обмежити кількість пасажів до 5–6 і періодично оновлювати вихідний калюс.

### 3.4. Пагоноутворення із верхівкових пагонів орхідеї

Апікальні пагони є ключовими джерелами експлантатів у процесі мікроклонального розмноження орхідей, особливо представників роду *Vanda*. Їх високий рівень меристематичної активності та здатність формувати вторинні пагони за відповідних умов культивування визначають важливість цього типу матеріалів [5, 10, 18].

Одним з вирішальних факторів успішного регенераційного процесу є правильно підібраний склад живильного середовища, зокрема оптимальний вміст фітогормонів. Взаємодія цитокінінів і ауксинів відіграє ключову роль у регуляції морфогенезу. Дослідження демонструють, що комбінація 6-бензиламінопурину (6-БАП) з низькою концентрацією індоліл-оцтової кислоти (ІОК) сприяє інтенсивному утворенню нових пагонів [2, 3, 10, 12].

У межах експерименту використовували верхівкові частини пагонів довжиною 0,4–0,6 мм. Експлантати піддавали стандартній стерилізації та переносили на модифіковане середовище Мурасіге і Скуга (МС), збагачене 6-БАП (1,0 мг/л) та ІОК (0,1 мг/л) [11]. Процес культивування проводився за температури  $25 \pm 1$  °С, освітленості 3000 лк і фотоперіоді 16/8 год.

На 6–7 тижні у культурі спостерігалось формування вторинних пагонів. Кількість утворених пагонів варіювала від одного до трьох на один експлантат, а їх середня довжина досягала 2,6 см. Консолідовані результати подано в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

#### Пагоноутворення у верхівкових пагонах орхідей роду *Vanda* на 7 тиждень культивування

Рослина	Кількість експлантатів	Кількість пагонів			Довжина пагонів, см
		Кількість пагонів 1 шт	Кількість пагонів 2шт	Кількість пагонів 3шт і більше	

Vanda	20	5	9	6	$2,5 \pm 0,11$
-------	----	---	---	---	----------------

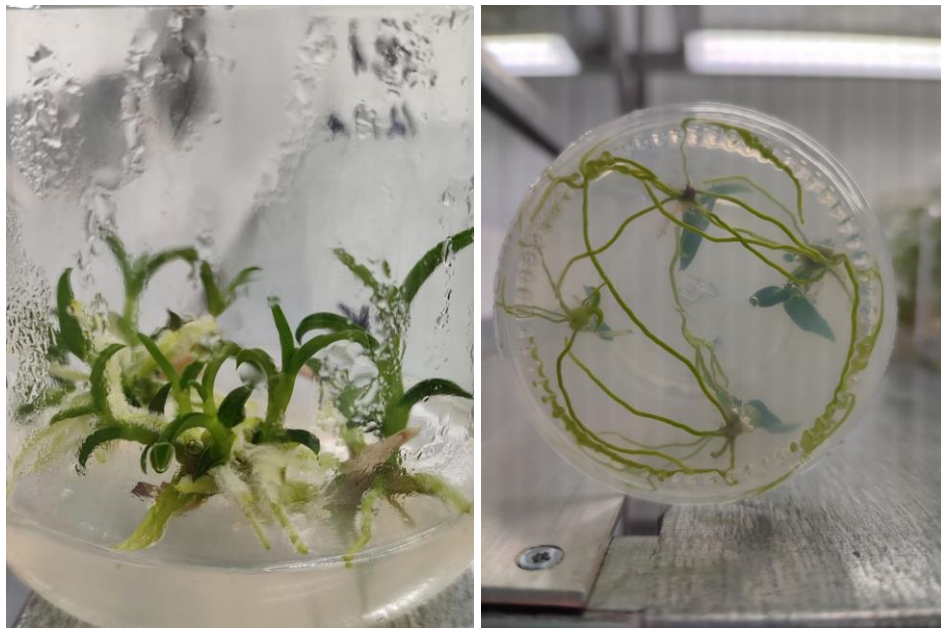


Рис. 3.6. Рослини-регенеранти з верхівкових пагонів орхідей роду *Vanda*.

Результати підтверджують, що оптимальна концентрація регуляторів росту, таких як 6-БАП і ІОК, сприяє активізації апікальних меристем та ефективному утворенню нових пагонів [10, 12, 18]. Це підкреслює доцільність використання верхівкових пагонів у мікроклональному розмноженні орхідей, оскільки ця методика забезпечує швидке одержання значної кількості якісного і генетично однорідного посадкового матеріалу.

### **3.5. Пагоноутворення Orchidaceae *Vanda* із листкових експлантатів з повітряними коренями і калюсом**

Дослідження закономірностей експериментального морфогенезу *in vitro* на різних рівнях організації, від окремих клітин до цілих органів, стали базою для створення ефективних технологій мікроклонального розмноження [2, 12, 36]. Одним із перспективних підходів є застосування листкових експлантатів із залишками повітряних коренів та калюсу для ініціювання пагоноутворення у рослин роду *Vanda* (Orchidaceae) [5, 10, 22]. Такий метод сприяє підвищенню коефіцієнта проліферації та пришвидшенню масового отримання здорового посадкового матеріалу [14, 36].

Метод прямого органогенезу передбачає утворення нових пагонів безпосередньо з клітин експлантату, оминаючи стадію калюсу, що забезпечує генетичну стабільність потомства [2, 33]. Проте для деяких сортів *Vanda* залучення калюсу як проміжної ланки активізує морфогенетичний потенціал тканин, чим сприяє покращенню показників регенерації [5, 10, 14].

Процес пагоноутворення у *Vanda* включає два основні механізми: розвиток пагонів із наявних меристематичних зон листа поблизу основи повітряного кореня або формування вторинних меристем через редиференціацію спеціалізованих клітин калюсу [5, 22, 34]. Обидва варіанти пов'язані з впливом фітогормонів, зокрема цитокінінів (6-БАП) і ауксинів (ІМК, НАА), у відповідних співвідношеннях [2, 12, 15].

У ході експерименту використовували листові експлантати розміром 1,5–2 см із залишками повітряного кореня. Культивування здійснювалося на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) із доданням 1,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ІМК за умов температури  $+25\pm 1^\circ\text{C}$ , фотоперіоду 16 годин, світлового потоку 3000 лк та відносної вологості 70–80% [11, 2, 16].

Через чотири тижні культивування пагоноутворення відмічалось в 83% експлантатів, причому кількість пагонів на один експлантат варіювала від 1 до 5. За шість тижнів середня кількість пагонів сягнула  $6,7 \pm 0,3$  на один експлантат, доводячи ефективність комбінованих експлантатів (лист + повітряний корінь) як джерела регенерації [5, 10, 22].

Таблиця 3.7

**Пагоноутворення у *Orchidaceae Vanda* із комбінованих експлантатів  
(лист + повітряний корінь + калюс)**

Час обліку	Пагони довжиною 1–2,9 см	Пагони довжиною 3–4,9 см	Пагони довжиною 5 см і більше	Всього пагонів
Через 4 тижні, шт	$42 \pm 2,1$	$18 \pm 0,9$	$6 \pm 0,3$	$66 \pm 3,3$

Через 6 тижнів, шт	$58 \pm 2,9$	$32 \pm 1,6$	$12 \pm 0,6$	$102 \pm 5,1$
--------------------	--------------	--------------	--------------	---------------

Процес утворення пагонів супроводжувався активною проліферацією калюсної тканини біля основи експлантату. Подальша диференціація цих утворень у апікальні структури свідчить про високий морфогенетичний потенціал даних органогенних центрів [10, 14, 34].

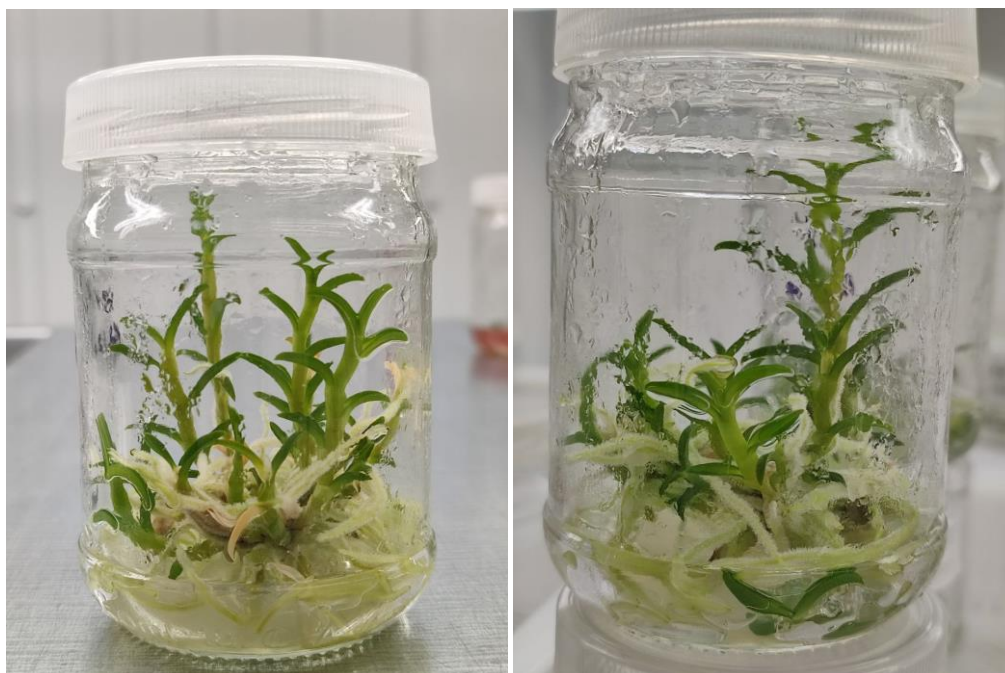


Рис. 3.7. Рослини-регенеранти Orchidaceae Vanda із листкових експлантатів з повітряними коренями і калюсом

Таким чином, результати дослідження підтверджують перспективність використання листкових експлантатів із залишками повітряних коренів і калюсу для регенерації у Vanda. Це дозволяє досягнути високої ефективності мікроклонального розмноження, мінімізувати ризик соматональної варіабельності та масово отримувати безвірусний посадковий матеріал для промислових потреб [5, 12, 36].

### 3.6. Різогенез рослин-регенерантів орхідеї Vanda in vitro

Укорінення рослин-регенерантів є фінальним і водночас одним із найскладніших етапів у процесі мікроклонального розмноження орхідей,

зокрема представників роду *Vanda*. Успішне формування кореневої системи відіграє ключову роль у подальшому рості рослин в умовах *in vivo* [39].

Індукція утворення коренів можлива за допомогою кількох підходів, зокрема:

- додавання ауксинів до живильного середовища;
- попередньої обробки базальної частини пагонів ауксинами з подальшим перенесенням їх на середовище без фітогормонів;
- використання активованого вугілля або затемнення нижньої частини пробірок, що зменшує світлову інтенсивність, яка пригнічує різогенез [38, 39].

Ряд дослідників рекомендують застосовувати напівконцентроване живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) без додавання регуляторів росту для стимуляції утворення кореневої системи [11, 39]. Інші ж вказують на переваги використання ауксинів, таких як нафтилоцтова кислота (НОК) або індолилмасляна кислота (ІМК) [2, 3].

У нашому дослідженні було вивчено вплив різних концентрацій НОК (0,5–2,0 мг/л) на процес утворення коренів у мікропагонах *Vanda* на агаризованому середовищі МС з половинною концентрацією мінеральних солей [2]. Для експерименту відбирали стандартні за розміром пагони з добре сформованими листовими розетками. Висаджування здійснювалося на такі варіанти живильного середовища:

- МСР1:  $\frac{1}{2}$  МС без регуляторів росту;
- МСР2:  $\frac{1}{2}$  МС + 0,5 мг/л НОК;
- МСР3:  $\frac{1}{2}$  МС + 2,0 мг/л НОК.

Результати експерименту узагальнені в таблиці 3.8. Найвищий відсоток укорінення спостерігався на варіанті МСР2 із додаванням 0,5 мг/л НОК, де вкоренилося 87,5% пагонів. Натомість варіанти МСР1 і МСР3 мали значно нижчі показники — 30% та 55% відповідно.

Таблиця 3.8.

**Вплив складу живильного середовища на укорінення пагонів орхідеї  
*Vanda***

Варіант	Склад середовища	Кількість пагонів, шт	Кількість укорінених пагонів, шт	% укорінення
1	½ МС	40	12	30%
2	½ МС + 0,5 мг/л НОК	40	35	87,5%
3	½ МС + 2,0 мг/л НОК	40	22	55%
	НІР05			±2,8



Рис. 3.7 Вигляд укорінених рослин-регенерантів *Vanda* на варіанті середовища МСР2.

Отже, за підсумками дослідження найефективнішим для стимуляції утворення кореневої системи у рослин-регенерантів орхідеї *Vanda* стало використання живильного середовища МС із половинною концентрацією макро- та мікроелементів і додаванням 0,5 мг/л НОК. Цей варіант забезпечує високий рівень укорінення, що робить його доцільним для використання у технологіях мікротклонального розмноження цього роду [37, 38].

## ВИСНОВКИ

1. В ході дослідження було встановлено, що найефективнішим методом стерилізації при підготовці до трансплантації орхідей Ванда є використання 70% етилового спирту протягом 30 секунд, після чого застосовувався 0,1% розчин сулеми на 5 хвилин. Ця методика забезпечила найкращі результати для стерилізації пагонів і коренів рослин. Також комбінація 0,08%  $\text{AgNO}_3$  (6 хвилин) та 0,1%  $\text{NaOCl}$  (10 хвилин) виявилася оптимальною для обробки листя, мінімізуючи ризик інфекції.

2. Застосування стерилізаційних агентів у поєднанні з повторним промиванням у стерильній дистильованій воді дозволило отримати чистий рослинний матеріал без ознак контамінації. Це стало критично важливим для підтримання асептичних умов та успішного культивування.

3. В умовах *in vitro* найкращі результати спостерігалися на середовищі МС (Murashige & Skoog) + 0,25 мг/л Кінетину, сахарозу (30 г/л), агар-агар (6–8 г/л) і регулятори росту, що змінювалися відповідно до фази розвитку експлантів. Перед стерилізацією середовища значення рН коригувалося в межах 5,6–5,8.

4. Оптимальними умовами для росту є: температуру 24–26 °С, світловий режим із 16 годинами освітлення (2000–3000 люкс) і 8 годинами темряви. У цих умовах відзначалося швидке зростання рослин, формування пагонів та закладання кореневої системи.

5. Для стимуляції формування коренів було розроблено модифіковане середовище зі зменшеним вмістом макро- і мікроелементів та підвищеним рівнем ауксинів (IAA, IBA, NAA). Це позитивно вплинуло на розвиток регенерантів і сприяло їх активному росту.

6. Чітко підібрана система стерилізації та оптимальна рецептура поживного середовища є ключовими факторами у мікроклональному розмноженні орхідей Ванда. Отримані регенеранти відзначалися високою частотою виживання та стабільністю морфологічних характеристик.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дьякова, І. М. (2018). Особливості вирощування орхідей в умовах закритого ґрунту. Київ: Аграрна освіта.
2. Кляченко, О. Л. (2020). Біотехнологія розмноження декоративних культур: навчальний посібник. НУБіП України.
3. Мазур, Т. В. (2016). Орхідні в кімнатній культурі: біологія та догляд. Львів: ЛНУ ім. І. Франка.
4. Слободянюк, В. М. (2017). Вплив мікрокліматичних умов на ріст і розвиток тропічних орхідей. Вісник аграрної науки, №3, 112–117.
5. Воробйова, І. І. (2020). Інноваційні методи розмноження орхідей роду *Vanda*. Вісник аграрної біотехнології, 13(5), 85-95.
6. Hew, C. S. (1994). *Orchids of Asia*. Times Editions, Singapore.
7. Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Trophic relationships between orchids and fungi: Mycorrhizae and beyond. *Botanical Review*, 66(1), 1–51.
8. Pridgeon, A. M. (1992). *The Illustrated Encyclopedia of Orchids*. Timber Press.
9. Kumar, S., & Ramakrishna, G. (2012). In vitro micropropagation and virus elimination in orchids: A review. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 13(1–2), 85–94.
10. Singh, S. K., Prakash, P., & Sharma, S. (2017). Micropropagation of *Vanda* orchids: Advances and challenges. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 1187–1200.
11. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
12. Козак, О. В. (2020). Мікропропагація рослин: технології та перспективи. Вісник аграрної науки, 3(41), 65–72.
13. Бойко, О. Ю. (2018). Біотехнологічні підходи до розмноження декоративних тропічних рослин. *Садівництво і виноградарство*, 68(4), 24–29.
14. Козак, П. (2020). Розмноження орхідей в лабораторних умовах. *Селекція та біотехнологія рослин*, 8(3), 45-56.

15. Боровик, І. (2018). Адаптація рослин до умов *in vitro*. Біотехнологічні дослідження, 12(1), 78-85.
16. Сидоренко, В. (2021). Контроль умов культивування рослин *in vitro*. Агротехнології та біоінженерія, 10(4), 53-60.
13. Wong S.M., Lee M.C. Viruses infecting orchids in Singapore // *Acta Horticulturae*. – 2001. – № 568. – С. 419–425.
14. Cassells A.C. Pathogen and pest resistance in micropropagated plants. In: *Micropropagation: Technology and Application*. – Springer, 1995. – С. 231–246.
15. Lim-Ho C.L., Lee Y.H. Virus elimination from orchid meristem cultures // *Plant Cell Reports*. – 1985. – Т. 4. – С. 218–221.
16. Wang H.L., Zhou Y. et al. Heat therapy for virus-free plant production // *Journal of Virological Methods*. – 2016. – Vol. 237. – P. 15–21.
17. Dijkstra J., de Jager C.P. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. – Springer, 1998. – 459 p.
18. Singh, R., et al. (2017). Micropropagation of Vanda orchids: A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 1–12.
19. Cassells, A. C., & Curry, J. P. (2001). Meristem culture for virus elimination in orchids. *HortScience*, 36(6), 1060–1063.
20. Kumar, S., & Ramakrishna, W. (2012). Meristem culture for virus elimination in orchids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48(6), 1–10.
21. Rao, P. S., et al. (2020). Virus elimination in orchids: A review. *Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–12.
22. Cassells, A. C., & Jones, R. A. C. (1998). Thermotherapy for virus elimination in orchids. *Plant Pathology*, 47(6), 1–10.
23. Walkey, D. G. A. (1991). Thermotherapy for virus elimination in orchids. *Plant Pathology*, 40(4), 1–10.
24. Lee, H. Y., et al. (2008). Thermotherapy and meristem culture for virus elimination in orchids. *Plant Disease*, 92(9), 1–7.

25. Panis, B., & Lambardi, M. (2005). Cryopreservation of orchid meristems. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41(3), 1–10.
26. Zhao, Y., et al. (2014). Thermotherapy for virus elimination in orchids. *Plant Pathology*, 63(1), 1–10.
27. Mink, G. I. (1993). Detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Disease*, 77(5), 1–10.
28. Ramakrishna, W., & Kumar, S. (2012). Meristem culture for virus elimination in orchids. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48(6), 1–10.
29. George, E.F., Hall, M.A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Dordrecht: Springer.
30. Debnath, S.C., Da Silva, J.A.T., & Thorpe, T.A. (2021). Biotechnology of ornamental plants. In: Jain, S.M., Ochatt, S.J. (eds). *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*. Humana Press.
31. Зозуля С.І., Сідлецький О.М. Технології розмноження квіткових культур методом культури тканин // Вісник аграрної науки. – 2020. – №3. – С. 55–62.
32. Діденко А.О. Сучасні методи мікроклонального розмноження орхідей // Біологічні системи: теорія і інновації. – 2018. – Т. 6, №2. – С. 112–118.
33. Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України. Звіт про наукову діяльність за 2020 рік. – Київ, 2021.
34. Радчук В.В., Сорока А.І. Особливості мікроклонального розмноження хризантем в умовах *in vitro* // Садівництво, виноградарство і виноробство. – 2019. – №4. – С. 23–27.
35. Кравченко О.В. Застосування культури тканин у мікроклональному розмноженні *Alocasia* // Агробіологія. – 2021. – №2(36). – С. 48–52.
36. Литвиненко Н.М. Мікроклональне розмноження гвоздик та гербер в умовах *in vitro* // Флора декоративна. – 2022. – №1. – С. 15–19.

37. Kumari A., Nath R. In Vitro Micropropagation of *Vanda tessellata* (L.) from Shoot Tip Explant // International Journal of Science and Research (IJSR). – 2014. – Vol. 3, Issue 10. – P. 1365–1368.

38. Ahmed M., Haque M.A., Haque M.S., Hossain M.M. In Vitro Regeneration and Root Induction in *Vanda pumila*, an Endangered Orchid // American Journal of Plant Sciences. – 2019. – Vol. 10, No. 6. – P. 941–950.

39. Бойко А. Л., Лахіна Л. О. Біотехнологія рослин: підручник. – К.: Ліра-К, 2020. – 488 с.

40. Білокон О. В. Основи біотехнології: навчальний посібник. – К.: Центр учбової літератури, 2018. – 276 с.

Додатки (копії публікацій)



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ  
І ЕКОЛОГІЇ

## **ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ**

**І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ**



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ  
ЛЮДСТВА»**

**23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

**УДК 113/119: 502/504**

**E45**

Збірник містить матеріали доповідей учасників XI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Екологія – філософія існування людства», що проходить 23-24 квітня 2025 р. на базі кафедри екології агросфери та екологічного контролю факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Мета конференції - підвищення ефективності та якості наукових досліджень, підтримки зв'язків у науковій галузі серед студентів, аспірантів, молодих вчених вищих аграрних навчальних закладів України та країн Європи, представлення, обговорення та використання результатів досліджень.

Матеріали конференції надруковані в авторській редакції, автори несуть відповідальність за поданий матеріал.

Відповідальні за випуск: Паламарчук С.П., Наумовська О.І.

Ухвалено вченою радою факультету захисту рослин, біотехнологій та екології (протокол №9 від 18 квітня 2025 р.).

<i>Сергієнчук В.Ф., Сербенюк Г.А.</i> <b>АНАЛІЗ ЗАПОДІЯНОЇ ШКОДИ ДОВКІЛЛЮ, ЕКОНОМІЦІ ПРИ НЕСАНКЦІОНОВАНОМУ ВИДОБУТКУ БУРШТИНУ</b> .....	155
<i>Скрипа В.О., Клепко А.В.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ БОЙОВИХ ДІЙ НА СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «СВЯТІ ГОРИ» В ДОНЕЦЬКІЙ ОБЛАСТІ</b> .....	156
<i>Софієнко І.В., Бережний С.М.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІВСЬКИЙ» В РАЙОНІ КАСКАДУ ГОРІХУВАТСЬКИХ СТАВКІВ</b> .....	158
<i>Терезман В.В., Юрасов С.М.</i> <b>ПРОГНОЗ РИЗИКУ ПОГІРШЕННЯ ЯКОСТІ ВОД РІЧКИ ДУНАЙ (КЛІЯ)</b> .....	160
<i>Тимошенська Д., Новікова О.І., Бережний С.М.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІВСЬКИЙ» ЛОКАЦІЇ ДІДОРІВСЬКОГО СТАВУ</b> .....	162
<i>Тишкевич М.І., Романчук М.С.</i> <b>ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ВОДОСХОВИЩА ЯЛПУТ-КУГУРЛУЙ ЗА ІНДЕКСОМ ЗАБРУДНЕННЯ (ІЗВ)</b> .....	164
<i>Турчин І.П., Таран О.П.</i> <b>ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ РОЗВИТКУ РОСЛИН КВАСОЛІ</b> .....	166
<i>У Жофань, Ладика М.М.</i> <b>ЩОДО ЯКОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ВОД ЗАТОПЛЕНОЇ ЗАПЛАВИ Р. ІРІНЬ</b> .....	168
<i>Урбановський С.М., Субін О.В.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ <i>DIANTHUS BARBATUS</i> В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i></b> .....	170
<i>Федоров М.Ю., Нагаєва С.П.</i> <b>ВПЛИВ БОЙОВИХ ДІЙ НА ЕКОСИСТЕМУ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «БЛЮБЕРЕЖЖЯ СВЯТОСЛАВА»</b> .....	171
<i>Філопенко Д.А.</i> <b>ЗМІНИ ВМІСТУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ В ТКАНИНАХ КОРОНА ЗА ДІЇ МІКОТОКСИНУ T2</b> .....	173
<i>Чинікулов О.Р., Табас С.Ю., Кудрявцева А.М.</i> <b>ЗАБРУДНЕННЯ ПРОДУКЦІЇ РОСЛИННИЦТВА – ЕКОЛОГІЧНИЙ ФАКТОР РАДІАЦІЙНОЇ НЕБЕЗПЕКИ УКРАЇНИ</b> .....	175
<i>Шандра В.В., Федуняшина В.В., Кудрявцева А.М.</i> <b>АГРОЕКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВНЕСЕННЯ ДОБРИВ НА РОБОТУ ФОТОСІНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ</b> .....	177
<i>Шецьова П.М., Таран О.П.</i> <b>ДОСЛІДЖЕННЯ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ РОСЛИН КАРТОПЛІ ПРИ УРАЖЕННІ ПАРАЗИТИЧНИМИ НЕМАТОДАМИ</b> .....	179
<i>Шихіна Д.С., Квітченко О.Л.</i> <b>ОЦІНКА І ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ ORCHIDACEAE VANDA</b> .....	181

УДК 502.211:582.581

**ОЦІНКА І ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ ORCHIDACEAE VANDA**

*Шишкіна Д.С.*, студентка 4 курсу спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», факультет захисту рослин, біотехнології та екології

*Кляченко О.Л.*, доктор с.-г. наук, професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття  
*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Орхідея Ванда (Orchidaceae Vanda) — рід багаторічних трав'янистих рослин родини орхідні. Це один із найпоширеніших родів орхідей у садівництві, оскільки його квіти ароматні, ефектні та мають тривалий термін зберігання. Коріння у рослин довге і товсте, з часом розростається, іноді досягаючи кількох футів у довжину. Сама рослина зазвичай росте від 6 до 10 дюймів, хоча є види, малі до 2 дюймів у дорослому віці. Стебло циліндричне, густо облистяє з м'ясистими ремнеподібними шкірястими дворядно розташованими листями. Рослини мають потужні повітряні корені сіро-зеленого кольору. Суцвіття прямостоячі або нахилені, пазушні, гроновидні, пухкі, мало-або багато квіткові. Квітки від малих до великих розмірів, часто яскраво забарвлені і строкаті, іноді ароматні. Рослини теплолюбні (вимагають температуру +22-25 °С), дуже світлолюбні, вимогливі до вологості повітря (70-90 %). Розмноження орхідних в умовах *in vitro* є досить ефективною і успішною стратегією для забезпечення сталого бізнесу внутрішнього та зовнішнього ринку, в садівництві, а також широко застосовується і для збереження виду в цілому. У природі виростає в тропіках Південного Китаю, Індії, Філіппін, Індонезії і Північній Австралії. На даний момент відомо близько 60 видів цієї орхідеї. Існує багато видів і гібридів цієї родини, але деякі рослини мають обмежений ареал і досить специфічні умови для росту та розмноження.

**Мета роботи.** Вивчити екологічні умови, в яких ростуть орхідеї, провести аналіз загроз, що впливають на їхнє існування, а також визначити ефективні стратегії для охорони їхніх природних ареалів.

**Матеріали та методи.** Дослідження базується на аналізі наукової літератури, даних про природні популяції, статистичних даних, результатах попередніх досліджень та лабораторних методах розмноження *in vitro*.

**Результати та їх обговорення.**

**Основні загрози для *Vanda* є:**

- втрата природних місць існування: вирубка лісів та забруднення навколишнього середовища, що зменшує площі, де рослини можуть процвітати.
- незаконний збір: попит на рідкісні орхідеї, зокрема на види Ванди, часто призводить до їх незаконного збору, що знижує популяції в дикій природі.
- зміни клімату: потепління та зміни в екосистемах можуть впливати на зростання орхідей, змінюючи умови, необхідні для їх розвитку.

Розмноження *in vitro* є ефективною стратегією для збереження та відновлення популяцій *Vanda*, дозволяючи масове розмноження рослин з високою ефективністю.

**Основними методами збереження біорізноманіття є:**

- Розробка та впровадження програм *ex situ* (розмноження *in vitro*, ботанічні сади, колекції);
- Створення природоохоронних територій *in situ*;
- Участь у міжнародних програмах з охорони (наприклад, CITES);
- Популяризація екологічної освіти та сталого використання ресурсів.

**Перспективи при дотриманні цих методів:** Дотримання біотехнологічних підходів та проведення екологічного моніторингу в майбутньому може привести не лише до збереження, а й відновлення чисельності популяцій *Vanda* у природі. Майбутні дослідження слід зосередити на вивченні генетичного розмаїття, адаптивних механізмів та розробці дієвих стратегій збереження.

**Висновок.** Збереження біорізноманіття *Vanda* вимагає комплексного підходу, що включає охорону природних середовищ існування, контроль за незаконним збором, використання біотехнологічних методів розмноження та підвищення екологічної свідомості населення.

#### **Список використаних джерел**

1. Hossain, M.M., Sharma, M., & Teixeira da Silva, J.A. (2013). *In vitro* propagation of *Vanda* orchids: a review. *Communicata Scientiae*, 4(4), 255–261.
2. Singh, A., & Roy, P. K. (2022). *In vitro* propagation and phytochemical analysis of *Vanda cristata*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 60(11), 843–850.

3. CITES. (n.d.). Non-detriment finding of *Vanda coerulea*. Retrieved from [https://cites.org/sites/default/files/ndf\\_material/WG4-CS4.pdf](https://cites.org/sites/default/files/ndf_material/WG4-CS4.pdf)
4. Kumar, P., & Sharma, M. (2020). Efficient propagation with in vitro seed germination of *Vanda falcata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(3), 567–574.
5. Fay, M.F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 425–436.
6. Chauhan, R.S., & Singh, A. (2021). A comprehensive review on threats and conservation status of orchids. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 9(1), 1–8.
7. Muharyati, Y., Setiyadi, M.W., Khatimah, A., & Ardiansyah, A. (2024). Propagation of the *Vanda helvola* Orchid In Vitro. *Jurnal Pijar Mipa*, 19(3), 488–492.

## IV ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ «ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ РОСЛИН»: ГУРТКІВЦІ ПРЕДСТАВЛЯЮТЬ СВОЇ НАУКОВІ ЗДОБУТКИ

Поділитись: 14 травня 2025 року

13 травня 2025 року на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології відбулася IV Всеукраїнська науково-практична конференція здобувачів вищої освіти «Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин», присвячена 127-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України. Захід зібрав здобувачів вищої освіти та надав можливість молодим науковцям обмінятися ідеями, представити результати власних досліджень і обговорити актуальні питання.

Конференція стала майданчиком для обговорення широкого спектра проблем, пов'язаних із сучасними викликами у сфері захисту та карантину рослин. Увага учасників була зосереджена на питаннях ранньої діагностики шкідливих організмів, вивчення біології збудників хвороб, пошуку біологічно безпечних методів боротьби, розробки інтегрованих схем захисту, що ґрунтуються на принципах наукової обґрунтованості та екологічної доцільності.

Учасники конференції представили різноманітні дослідження, що охоплюють важливі аспекти захисту сільськогосподарських культур. Вибір тем зосереджувався на питаннях, пов'язаних з хворобами та методами діагностики.

На конференції були представлені доповіді учасників гуртка «Фітопатологія», серед яких презентували змістовні та цікаві роботи студенти: **Гольцбергер Йосип** – «Хвороби насіння ріпаку озимого», **Пастух Тарас** – «Мікофлора насіння сої» та **Чепчак Михайло** – «Динаміка розвитку білої гнилі соняшнику».