

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ ЕПІДЕРМИ ЛИСТКІВ ОРХІДЕЇ *BLETILLA STRIATA* ЗА УМОВ АДАПТАЦІЇ *EX VITRO*

М.Б. ГАПОНЕНКО¹, А.М. ГНАТЮК¹, О.Л. АНДРУЩЕНКО¹,
К.В. ЛИСТВАН², О.О. ОВЧАРЕНКО^{2*}, В.А. РУДАС², Д.Б. РАХМЕТОВ¹

¹ Національний ботанічний сад імені М. М. Гришка НАН України,
вул. Садово-Ботанічна, 1, Київ, 01014, Україна

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: gaponenko@nbg.kiev.ua, gnatiukalla@gmail.com, helen.amaranth@gmail.com,
lystvan@ukr.net, ovcharenkooo77@gmail.com, rudasv@gmail.com, rjb2000.16@gmail.com

Автор для кореспонденції – Овчаренко О.О., e-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

Блетіла смугаста (Bletilla striata (Thunberg) H. G. Reichenbach) є представником родини Orchidaceae Juss. Рослину вирощують в оранжерейній культурі як декоративну, також вона є цінною як сировина для лікарських засобів. У зв'язку з цим розробка технологій культивування та розмноження B. striata є актуальною. Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей продигового апарату листків рослин B. striata за мікроморфологічною будовою їх поверхні у процесі адаптації до умов вирощування ex vitro. Структуру епідерми листків використали як біологічний маркер адаптації рослин, щоб оцінити вплив умов вирощування in vitro, розмножували та переносили ex vitro в умови відкритого ґрунту (Київ, Україна). Структуру епідерми листків, сформованих in vitro та ex vitro, досліджували за допомогою оптичної мікроскопії. Встановлено, що листки B. striata амфістоматичні, проте на адаксіальній поверхні продихи траплялися рідко. Щільність продихів на абаксіальній поверхні в середньому становила 70–85 шт/мм², їх розміри по замикаючим клітинам – 36.16 × 29.61 μm, продихові щілини – 22.83 × 10.89 μm. Порівняння мікроморфометричних показників продигового апарату виявило статистично достовірні відмінності у параметрах форми продихів рослин, культивованих in vitro, та тих, що були перенесені до відкритого ґрунту. Встановлено також статистично достовірне збільшення щільності продихів абаксіальної поверхні листків та зменшення кількості епідермальних клітин на адаксіальній поверхні у рослин ex vitro. Отже, відповідь на зміну умов вирощування відобразилась у структурі епідерми листків. Це свідчить про успішність процесів адаптації у рослин та сприятливі умови культивування.

Ключові слова: Orchidaceae Juss, розмноження in vitro, ex vitro, продихи, адаптація, мікроморфологія.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

Вступ. Блетіла смугаста (*Bletilla striata* (Thunberg) H.G. Reichenbach) є представником родини Orchidaceae. Рослина є характерною для субтропічного клімату і природно зростає в Японії, Китаї, Кореї, М'янмі, В'єтнамі, на Курільських островах (Chen et al, 2009). Поширена в оранжерейній культурі як декоративна рослина та є цінною для вирощування у якості лікарської сировини (He et al, 2017; Chen et al, 2020; Ji et al, 2020; Wang et al, 2020; Li et al, 2021a; Li et al, 2021b; Gou et al, 2022; Hu et al, 2022; Liu et al, 2022; Xiang et al, 2022; Jiang et al, 2023; Zhu et al, 2023).

Для представників родини Orchidaceae Juss ефективним методом розмноження ex situ є культивування in vitro. Умови у культивативних ємностях in vitro часто обумовлюють формування ювенільних рослин зі змінами анатомічної будови листків та їх продигового апарату, що призводить до певних порушень водного статусу, а інколи й до загибелі рослин при постасептичній адаптації ex vitro (Hazarika, 2003).

Анатомо-стоматографічні ознаки є важливими для оцінки адаптаційного потенціалу при інтродукції рослин родини Orchidaceae Juss, що має велике значення для розробки оптимальних біотехнологій (Buyun, 2013). У зв'язку із змінами клімату у бік потепління ми розглядаємо перспективи вирощування цієї орхідеї у відкритому ґрунті на території України для виробництва цінної лікарської сировини та як декоративної рослини.

Критичним періодом при розмноженні рослин in vitro є їх постасептична адаптація до умов культури та впливу навколишнього середовища. Структура епідерми листків може бути ви-

користана як біологічний маркер адаптаційної здатності рослин при зміні умов *in vitro* → *ex vitro*, отже, дані порівняльного анатомо-стоматографічного дослідження поверхні листка рослин можна використовувати для прогнозування успішності акліматизації ювенільних рослин, отриманих *in vitro*.

Метою нашої роботи було з'ясувати особливості структурної адаптації рослин *B. striata* за мікроморфологічною будовою поверхні листків при різних умовах вирощування — *in vitro* та *ex vitro*. Завданням роботи була оцінка впливу вирощування за даних умов на структури епідермісу; визначення кількісних критеріїв будови абаксіальної та адаксіальної поверхні листка (щільність продихів, кількість основних епідермальних клітин на одиницю поверхні, розміри продихів, їх форма); з'ясування напрямів структурної адаптації рослин при зміні умов та оцінка адаптаційної здатності рослин за цим критерієм.

Матеріали та методи. Вихідний рослинний матеріал. У роботі використано рослини *B. striata*, придбані у комерційній фірмі «Флоріум». Загальний вигляд суцвіття *Bletilla striata* наведено на рис. 1.

Для введення в культуру *in vitro* використовували апікальні меристеми псевдобульб та нерозкриті плоди *B. striata*, які мали цілісну оболонку.

Введення в асептичну культуру та культивування *in vitro*. Нерозкриті плоди *B. striata* з насінням промивали проточною водою, вміщували по чергові в 70%-вий етанол на 2 хв та в комерційний розчин «Білизни» на 15 хв. Після стерилізації матеріал тричі промивали стерильною дистильованою водою. Надалі плід підсушували на фільтрувальному папері від залишків вологи, розтинали та насіння переносили на агаризоване середовище МС (Murashige, Skoog, 1962). Насіння культивували при температурі 25 °С, в темряві протягом місяця. Надалі переносили в умови культиваційної термальності кімнати при температурі 25 °С, освітленості 3000 люкс і 16-ти годинному світловому фотоперіоді. Асептичну культуру підтримували в культурі *in vitro* шляхом поділу. Субкультивування проводили кожні 4 тижні.

Для введення в культуру *in vitro* використовували також апікальні меристеми псевдобульб.

Для отримання асептичної культури з цих експлантів псевдобульби, що проростають, промивали впродовж двох годин під проточною водою для звільнення від залишків субстрату. Після того, промивали з детергентом і послідовно стерилізували в 70%-вому розчині етанолу (1 хв), гіпохлориду натрію (15 хв) та в 0,1%-вому розчині діациду ртуті (20 хв) і 5 разів промивали стерильною дистильованою водою. Вичленовували верхівкові бруньки і поміщали їх на живильне середовище МС. Верхівкові бруньки культивували в темряві впродовж тижня, після того переносили в умови культиваційної кімнати на світло. У подальшому первинну рослинну культуру при наростанні дочірніх псевдобульб на молодих рослинах розмножували поділом.

Адаптація рослин *ex vitro*. Рослини, які активно вегетували, та ті, що почали формувати псевдобульби при подовженому періоді між субкультивуванням висаджували для адаптації *ex vitro* у ємності з сумішшю кокосового субстрату і піску.

Після 2 тижневої адаптації у захищеному ґрунті рослини переносили у відкритий ґрунт на дослідній ділянці у напівтінь із забезпеченням штучного поливу. Рослини було висаджено у 2 терміни: 30 травня та 25 липня.

Характеристика погодних умов вегетаційного сезону. Погодні умови сезону 2023 року у м. Києві (за даними сайту <https://meteopost.com/pogoda/kiev/>) характеризувалися стійким перевищенням кліматичної норми середньомісячної температури повітря. Найвищим воно було у серпні та вересні і мало відхилення від багаторічної норми на 5.2 і 4.9 °С відповідно (табл. 1).

На тлі підвищеної температури спостерігалось нерівномірне забезпечення вологою впродовж року. Не зважаючи на деяке перевищення річної норми суми опадів (на 6,7 мм), траплялися місяці із різкими відхиленнями від норми або в бік перевищення, або в бік їх дефіциту (табл. 1). Так, у квітні опади перевищили місячну норму удвічі, а у травні були майже відсутні. Далі — критична нестача вологи у серпні та вересні змінилася надмірним випаданням опадів у жовтні і листопаді, що були майже вдвічі більші за норму. У період відсутності природних опадів нестачу вологи компенсували поливом.

Морфологічні дослідження епідерми. Для дослідження епідерми було використано повністю розвинені листки ювенільних рослин *B. striata*, утворені у культурі *in vitro*, а також листки, що сформувались (*ex vitro*) в умовах відкритого ґрунту Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (м. Київ). Для дослідження епідерми листків випадковим методом відібрали по 10 рослин, вирощені *in vitro* та *ex vitro*, у кожної рослини один повністю розвинений листок був відібраний для досліджень.

Дослідження епідерми здійснювали модифікованим методом відбитків (Pompelli et al, 2010). Як покриття використовували безкольоровий лак, який наносили на середню частину листової пластинки на адаксіальну та абаксіальну поверхню смугою 1 см. Дослідження здійснювали за допомогою світлових мікроскопів (Biolar (Польща) та Microscope ZEISS Axio Imager 2 (Німеччина)). Фотофіксацію здійснено цифровим фотоапаратом, яким оснащений мікроскоп ZEISS. Підрахунок кількості основних клітин епідермісу і продихів, встановлення розмірів продихового апарату в полі зору мікроскопа відомої ділянки проводили на репліках з 5–10-кратним повторенням.

Кількість продихів та підрахунок клітин епідермісу на абаксіальній та адаксіальній поверхнях підраховували на різних збільшеннях



Рис. 1. Суцвіття *Bletilla striata* (Thunberg) H. G. Reich., культивованої в умовах захищеного ґрунту

(100×, 200×), оскільки їх щільність відрізнялася у кілька десятків разів. Для встановлення значень щільності продихів (кількості продихів на 1 мм²) та продихового індексу (співвідношення кількості продихів до загального числа основних клітин епідермісу) здійснювали перерахунок на 1 мм² (Pompelli et al, 2010).

Вимірювання параметрів продихового апарату здійснювали за допомогою програми Axio Vision Release 4.7 за збільшення 400×. Врахо-

Таблиця 1. Середньомісячні значення температури повітря (°C) та кількості опадів (мм) за 2023 рік у Києві

Місяць	Температура повітря, °C	Відхилення від норми	Кількість опадів, мм	Відхилення від норми
I	−0,3	5,3	20,2	−27,8
II	−0,3	3,9	30,1	−15,9
III	4,8	4,1	40,7	1,7
IV	9,6	0,9	102,6	53,6
V	16,2	1,0	1,0	−52,0
VI	19,6	1,4	87,6	14,6
VII	21,5	2,2	136,1	48,1
VIII	23,8	5,2	19,6	−49,4
IX	18,8	4,9	8,6	−38,4
X	11,4	3,3	67,2	32,2
XI	4,1	2,0	99,2	48,2
XII	−1,9	0,4	43,6	−8,4
Рік	10,6	2,9	656,7	6,7

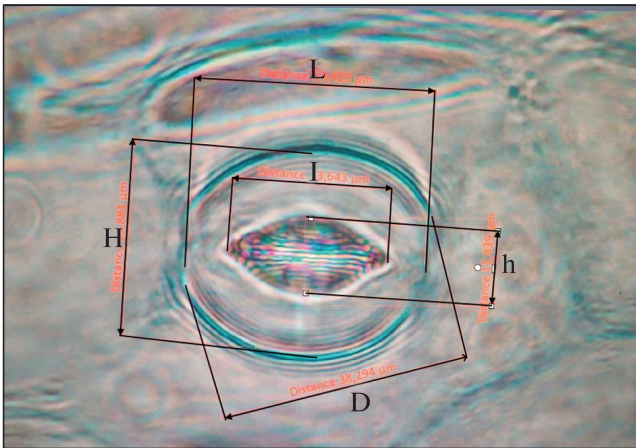


Рис. 2. Параметри продихів, що вимірювали (D – найбільший діаметр по замикаючим клітинам, L – довжина та H – ширина замикаючих клітин, l – довжина та h – ширина продихової щілини)

ували 5 параметрів, що стосувались замикаючих клітин та продихової щілини: D – найбільший діаметр по замикаючим клітинам, L – довжина та H – ширина замикаючих клітин, l – довжина та h – ширина продихової щілини (рис. 2). Для опису форми продихів рослин обчислювали індекс форми: $I_f = H/D$.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали методами математичної статистики за допомогою Microsoft Excel 2016. У таблицях наведено наступні статистичні показники: $\max$ – найбільше значення, $\min$ – найменше значення, M – середнє, SD – стандартне відхилення, V – коефіцієнт варіації. Для оцінки відмінностей між ознаками використано U -критерій Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. При введенні рослинного матеріалу *B. striata* в асептичну культуру за допомогою насіння спостерігали меншу контамінацію зразків, порівняно з матеріалом отриманим з псевдобульб, що узгоджується з літературними даними про їх внутрішню контамінацію (Wu et al 2022). Після проростання насіння отримували протокорми, з яких в подальшому регенерували рослини (рис. 3, а, б). Рослини, які в умовах *in vitro* формували 2–3 зелені листки, найбільший з яких був 6 см завдовжки та 0,8 см завширшки, висаджували для попередньої адаптації в горщики (рис. 3, в).

Рослини на момент посадки переважно мали 2–3 сформовані зелені листки від 1,0 до 6,0 см

завдовжки та 0,3–0,8 см завширшки (рис. 4, а). Впродовж 2-х місяців вирощування у відкритому ґрунті рослини сформували 3–5 нових листків 1,8–6,7 см завдовжки та 0,6–1,1 см завширшки та в основі пагона утворили напівзанурені в ґрунт псевдобульби 0,3–0,5 см в діаметрі (див. рис. 4, б).

Усі листки були видовжено-ланцетні із гострою верхівкою та гладеньким краєм, жилкування дугове. На кожному листку спостерігали від 6 до 18 жилок, які відповідно до відбитків епідерми, були утворені 4–6 (8)-ма рядами видовжених клітин. Від краю листка до центру кількість рядів клітин у жилках збільшувалася. Найтовща центральна жилка у досліджених листків містила 18 рядів клітин по ширині.

Продихова провідність змінюється у відповідь на зміни умов середовища. Загалом провідність продихів більша при вищій інтенсивності світла, вологості, високому вмісті води в ґрунті та нижчій концентрації CO_2 (Hikosaka et al, 2016). Здатність рослин пристосовуватись до нових умов середовища існування є визначальною для росту та виживання (Terashima et al, 2005). Структури листків своєю реакцією відображають наслідки дефіциту води більш виразно, ніж інші частини рослин, зокрема стебла чи корені (Ennajeh et al, 2010).

Продиховий апарат відіграє важливу роль у їх адаптації до різних умов навколишнього середовища. Реакції продихів є важливими для адаптації рослин до змінних умов і, таким чином, є детермінантами виживання рослин (Hetherington, Woodward, 2003; Aasamaa, Sober, 2011). Чутливість продихів до водного потенціалу в рослині й до вологості повітря більша, ніж до чинників пов'язаних з процесами фотосинтезу (концентрацією CO_2 , інтенсивністю освітлення) (Aasamaa, Sober, 2011). Газообмін у вищих рослин в основному визначається розмірами і щільністю розташування продихів. Більша кількість продихів свідчить про вищу інтенсивність продихової транспірації. У середньому у ксерофітів менше продихів на одиницю площі, ніж у мезофітів, а в межах одного виду їх число може зменшуватися в результаті адаптації до посушливих умов місцезростання.

Важливим є також їх розподіл на абаксальний та адаксіальний поверхні листків, хоча для рослин, листки яких відходять під значним ку-



Рис. 3. Рослини *Bletilla striata* (Thunberg) Н. Г. Reich. *in vitro* (а, б); рослини *ex vitro* у субстраті перед висадкою у відкритий ґрунт (в)



Рис. 4. Рослини *Bletilla striata* (Thunberg) Н. Г. Reich. *ex vitro*: а — одразу після висадки у травні; б — через п'ять місяців вирощування у відкритому ґрунті (ціна поділки лінійок — 1 см)

том до горизонталі, така тенденція майже не простежується. Отже, структура продихового апарату відображає пристосування рослинно-го організму до умов вирощування, а саме: інтенсивності сонячної радіації, температури і вологості. Хоча ця особливість є видоспецифічною і формувалася філогенетично, вона може змінюватись у межах виду рослин залежно від умов зовнішнього середовища згідно норми реакції генотипу. У разі перенесення рослин у нові умови в структурі продихового апарату відбуваються кореляційні зміни через адаптивні процеси, які активуються в рослинному організмі (Krugliak, 2018).

Листки *B. striata* амфістоматичні — продихи присутні на обох сторонах листка, але переважно розміщені на абаксальній поверхні

(рис. 5). Епідерма без видимої кутикули, гладенька, продихи з чіткими отворами. На адаксіальній поверхні продихи трапляються рідко, розміщені поодинокі або групами по 2–3, часто більш занурені, ніж продихи абаксальної поверхні, на відбитках це відображено як перекриття епідермальними клітинами країв замикаючих клітин. З абаксального боку продихи розміщені переважно у міжжилковому просторі після другої-шостої від краю листка жилки. Однак спостерігали розміщення продихів і на жилках (рис. 5, в). З адаксіального боку продихи частіше зустрічаються по краю листової пластинки. Усі продихи орієнтовані паралельно поздовжній вісі листка.

Абаксальні та адаксіальні епідермальні клітини полігональні, у переважній більшості

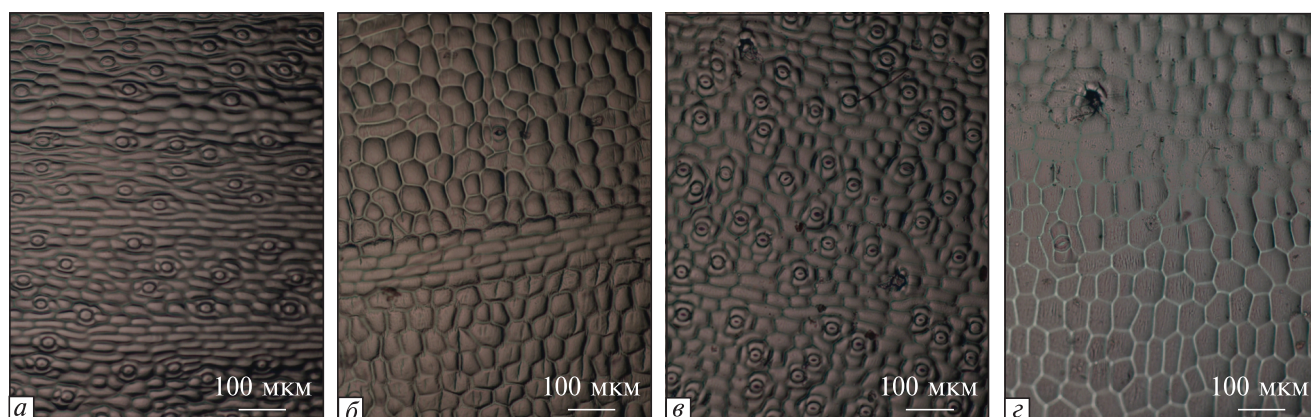


Рис. 5. Мікроморфологічна будова епідерми листків *Bletilla striata* (Thunberg) H. G. Reich. у різних умовах вирощування (а, б – in vitro, в, з – ex vitro; а, в – абаксіальна; б, з – адаксіальна поверхня)

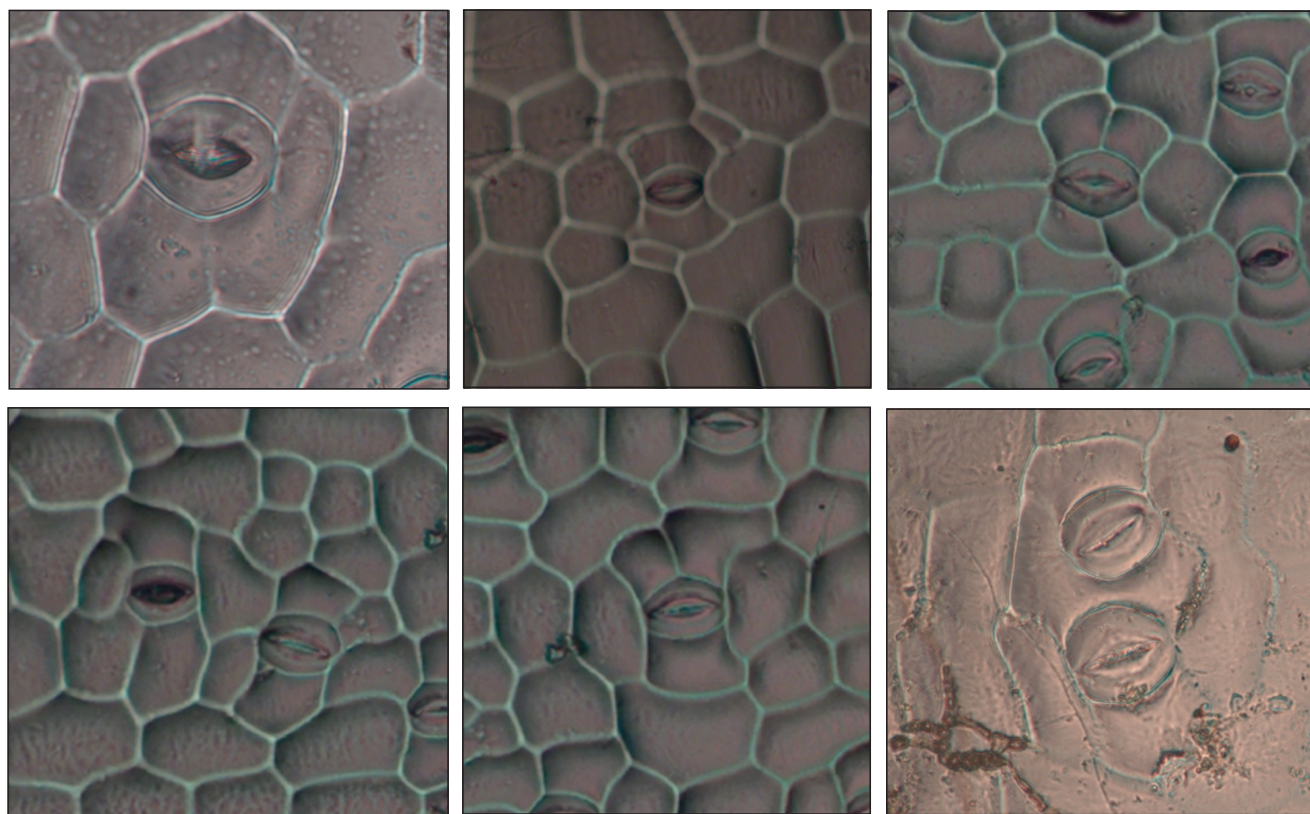


Рис. 6. Атипові продихи епідерми листків *Bletilla striata* (Thunberg) H. G. Reich

гексагональні зі закругленими краями. Клітини епідермісу з абаксіального боку мають менші розміри та видовжені у напрямку провідних жилок. Антиклінальні стінки адаксіальних епідермальних клітин також утворюють переважно неправильний шестикутник, проте довші стінки розташовані перпендикулярно провідним жилкам.

Наземні види представників *Orchidaceae* зазвичай характеризуються наявністю аномалічного типу продихів, трапляються також випадки поєднання різних типів продихів на одному листку (Singh, 1981). Про таке поєднання повідомляють Aybeke та Sezic (2008), які виявили, що у епідермі низки видів (*Ophrys apifera* Huds., *O. cornuta* Stev., *O. sphegodes* Mill.,

Dactylorhiza romana (Sebast.) Soy, *Orchis morio* (L.) R.M.Bateman subsp. *morio*) присутні одночасно аномоцитні і тетрацитні продихи. *B. striata* можемо віднести до найменш характерної групи видів із тетрацитним типом продихів, подібно до *Orchis coriophora* L. та *O. morio* subsp. *picta*. Отже, продихи оточені переважно чотирма епідермальними клітинами. Проте виявили також нетипові продихи, зокрема, оточені 5-ма чи 7-ма клітинами, парні продихи (рис. 6), які зрідка трапляються на обох сторонах листка як у рослин *in vitro*, так і *ex vitro*.

Структура епідерми листка реагує на зміну умов культивування, формуючи нову архітектуру в новоутворених органах. За даними Lake et al (2001) зрілий листок сприймає інформацію про зміни у зовнішньому середовищі та передає сигнали, під впливом яких змінюється щільність продихів у листках, що розвиваються (He et al, 2018).

Щільність продихів — ознака, що варіює у широких межах, оскільки залежить від екологічних умов. В цілому, середня щільність продихів на листках досліджених нами ювенільних рослин *B. striata in vitro* → *ex vitro* коливалась в межах від 36 до 108 на мм² (табл. 2), тоді як за даними Li et al (2018) — від 90 до 165 на мм². Експериментальні дослідження *B. striata* з культури тканин, проведені у Китаї у контрольованих умовах (на суглинковому ґрунті за середньорічної температури 15,0 °C, річної тривалості сонячного освітлення 1252,8 години при відносній вологості повітря 82 %) показали щільність продихів у межах 60–90 шт/мм² (Gao et al, 2022). Щільність продихів на абаксальній поверхні листків рослин *B. striata*, які

досліджували, становила 70–85 шт/мм², залежно від умов вирощування (табл. 2). Результати досліджень показали, що адаксіальна поверхня містить поодинокі продихи, які частіше трапляються на краях листової пластинки.

Висока щільність менших продихів — адаптація для збільшення інтенсивності газообміну (He et al, 2018). У нашому експерименті така тенденція при перенесенні рослин з умов *in vitro* у незахищений (відкритий) ґрунт слабо виражена, проте збільшення щільності продихів з абаксального боку листової пластинки є статистично достовірною, що доводить аналіз із використанням критерію Манна-Уїтні ($U = 113,0$; $p \leq 0,01$). Стабільною залишалася щільність епідермальних клітин, і продиховий індекс абаксальної поверхні залежав саме від щільності продихів. Збільшення продихового індексу має статистично значущу відмінність ($U = 88,0$) на рівні $p \leq 0,01$. Більш виразно змінилась щільність епідермальних клітин на адаксіальній поверхні: їх кількість зменшилась у рослин *ex vitro* ($U = 12,5$; $p \leq 0,01$) за рахунок збільшення розмірів. Щільність продихів адаксіальної поверхні є надзвичайно малою і нерівномірною. Різниця даного показника ($U = 182,5$; $p \leq 0,01$), а також продихового індексу ($U = 185,0$; $p \leq 0,01$), не мала статистичної значущості. Це свідчить про адаптивну реакцію ювенільних рослин на умови відкритого ґрунту. Рослини, сформовані в умовах *ex vitro*, змінили структуру епідерми листків задля підвищення стійкості в нових умовах зростання.

Оцінювання розмірних характеристик продихів у досліджуваних рослин в умовах Києва вказує на несуттєве зменшення їх у рослин

Таблиця 2. Структура епідерми листків *Bletilla striata* (Thunberg) H. G. Reich.

Поверхня листка	Щільність продихів				Кількість епідермальних клітин на 1 мм ²				Продиховий індекс, %
	M ± SD	max	min	V, %	M ± SD	max	min	V, %	
in vitro									
Адаксіальна	0,5 ± 0,3	0,90	0,41	208,8	515,3 ± 20,3	666	360	17,1	0,05 ± 0,01
Абаксіальна	70,2 ± 4,5	108	36	28,1	726,8 ± 39,6	1134	522	23,7	8,80 ± 0,30
ex vitro									
Адаксіальна	0,2 ± 0,1	0,36	0,05	247,9	324,5 ± 12,7	450	270	17,0	0,09 ± 0,04
Абаксіальна	85,5 ± 4,3	108	45	21,7	726,3 ± 20,2	837	540	12,1	10,50 ± 0,30

Таблиця 3. Морфометричні показники продихового апарату епідерми листків *Bletilla striata* (Thunberg) Н. G. Reich., мкм

Показник	Абаксіальна поверхня						Адаксіальна поверхня					
	D	L	H	l	h	I _f	D	L	H	l	h	I _f
<i>in vitro</i>												
max	42,24	39,42	33,85	26,69	13,33	0,87	40,31	38,73	38,14	26,35	14,45	1,00
min	3,99	3,41	22,46	15,69	10,01	0,63	31,47	28,57	24,31	18,11	9,00	0,72
M	36,93	35,20	28,58	22,42	11,67	0,77	35,59	33,71	31,15	22,32	12,02	0,87
SD	3,33	2,80	3,60	3,13	0,85	0,06	2,85	2,52	3,95	2,45	1,44	0,08
V, %	0,09	0,08	0,13	0,14	0,07	0,07	0,08	0,07	0,13	0,11	0,12	0,10
<i>ex vitro</i>												
max	44,09	43,5	31,06	31,34	11,8	0,92	38,87	37,28	34,12	27,36	12,73	0,96
min	28,35	26,8	24,64	16,94	7,89	0,66	33,03	31,04	25,75	21,94	7,73	0,67
M	35,43	33,54	27,60	22,65	9,57	0,79	35,85	33,92	29,48	24,13	10,40	0,82
SD	4,45	4,36	1,86	3,66	0,98	0,08	1,97	1,96	2,82	1,64	1,38	0,08
V, %	0,13	0,13	0,07	0,16	0,10	0,10	0,06	0,06	0,10	0,07	0,13	0,10

після перенесення в умови відкритого ґрунту (табл. 3). У середньому у досліджених рослин продихи разом із замикаючими клітинами мали розміри $36,16 \pm 3,34 \times 29,61 \pm 3,12$ мкм, а самі продихові щілини $22,83 \pm 2,90 \times 10,89 \pm 1,53$ мкм. Дослідження Akbulut et al (2017) показали, що продихи рослин *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., вирощених в умовах високогір'я, були більшими. Ми не виявили статистично значимих відмінностей зменшення розмірів продихів за умов *ex vitro*, що дозволяє вважати адаптацію рослин успішною, а умови зростання інтродукованих рослин прийнятними.

Оцінювання форми продихів за допомогою індексу форми в різних умовах вирощування показало, що форма продихів при перенесенні рослин з *in vitro* до *ex vitro* дещо змінюється. Середній Індекс форми продихів рослин *in vitro* склав $0,95 \pm 0,05$ ($V = 0,09$), а для рослин *ex vitro* $0,80 \pm 0,8$ ($V = 0,10$), тобто продихи листків у рослин, перенесених в умови відкритого ґрунту, набули більш видовженої форми (відмінності статистично значущі, $U = 38,0$, $p \leq 0,01$).

Також більш видовжену форму мали продихи абаксіальної поверхні у порівнянні з адаксіальною у рослин *in vitro* (відмінності статистично значущі, $U = 33,5$, $p \leq 0,01$), при цьому значущої різниці між продихами з різних сторін листка у рослин *ex vitro* не встановлено.

Висновки. Результати досліджень показали, що стрес, обумовлений перенесенням рослин, вирощених *in vitro*, із захищеного ґрунту у відкритий не мав негативного впливу на характеристики продихового апарату епідерми листків ювенільних рослин *B. striata*. Відповідь на зміну умов вирощування відобразилась у структурі епідерми листків збільшенням щільності продихів абаксіальної поверхні листової пластинки, зменшенням кількості епідермальних клітин на адаксіальній поверхні та зміною форми продихів у рослин *ex vitro*. Це свідчить про сприятливі умови культивування та успішність процесів адаптації у рослин.

Дотримання етичних стандартів. Використані в роботі рослини були вирощені в культурі і з природи не були вилучені.

Конфлікт інтересів. У цій роботі конфлікт інтересів авторів відсутній.

Фінансування. Робота виконана за фінансової підтримки НАН України: проєкт № 0123U102163 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук в рослинах». Розділ 2. Розробка сучасних біотехнологій умов культивування лікарських рослин для отримання фітосировини з підвищеним вмістом біологічно активних фенольних сполук та флавоної-

дів (шифр 7.5/2-2023) та проєкт № 0123U101081 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук в рослинах». Розділ 1. Створення біотехнологічних ліній рослин, які накопичують рекомбінантні фармацевтично цінні білки, зокрема з антибактеріальною (бактеріоцини) та антивірусною (інтерферон альфа 2в та гриффітсин) активністю. Розробка біотехнологій для підвищення синтезу в лікарських рослинах нативних біологічно активних сполук, які є складовими медичних препаратів, що використовуються для подолання наслідків воєнних дій.

PECULIARITIES OF LEAF EPIDERMA IN ORCHID *BLETILLA STRIATA* UNDER EX VITRO ADAPTATION

M. Gaponenko, A. Gnatiuk, O. Andrushchenko, K. Lystvan, O. Ovcharenko, V. Rudas, D. Rakhmetov

¹ M.M. Hryshko National Botanical Garden

of the National Academy of Sciences of Ukraine, str. Sadovo-Botanichna, 1, Kyiv, 01014, Ukraine

² Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, str. Akademika Zabolotnoho, 148, Kyiv, 03143, Ukraine
E-mail: gaponenko@nbg.kiev.ua, gnatiukalla@gmail.com, helen.amaranth@gmail.com, lystvan@ukr.net, ovcharenkooo77@gmail.com, rudasv@gmail.com, rjb2000.16@gmail.com

Bletilla striata (Thunberg) H. G. Reichenbach) is a member of the Orchidaceae Juss. The plant is grown in greenhouse culture as a decorative plant, and it is also valuable as a raw material for medicinal products. In this regard, the development of *B. striata* cultivation and propagation technologies is relevant. The aim of the work was to find out peculiarities of the leaf stomata of *B. striata* plants based on the micromorphological structure of their surface during adaptation to the *ex vitro* conditions. The leaf epidermis structure was used as a biological marker of plant adaptation to assess the influence of *in vitro* and *ex vitro* growing conditions. Plants were propagated *in vitro* and transferred *ex vitro* to outdoors conditions (Kyiv, Ukraine). The structure of the leaf epidermis formed *in vitro* and *ex vitro* was studied using optical microscopy. We found that the leaves of *B. striata* are amphistomatic, but stomata rarely occur on the adaxial surface. The density of stomata on the abaxial surface is on average 70–85 pcs/mm², their dimensions according to the guard cells are 36.16 × 29.61 μm, the stomatal pores are 22.83 × 10.89 μm. Morphometric parameters of the stomatal

apparatus revealed statistically significant differences in the shape parameters of the stomata between plants cultivated *in vitro* and grown outdoors. A statistically significant increase of the stomata density on the abaxial leaf surfaces and a decrease in the number of epidermal cells on the adaxial surface of *ex vitro* grown plants were also established. So, the changes in growing conditions were reflected in the structure of the leaf epidermis. This indicated the success of plant adaptation and favorable cultivation conditions.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aasamaa K, Sober A (2011) Stomatal sensitivities to changes in leaf water potential, air humidity, CO₂ concentration and light intensity, and the effect of abscisic acid on the sensitivities in six temperate deciduous tree species. *Environ Experim Bot* 71:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.013>
- Akbulut M, Seker S, Senel G (2017) Stoma features in leaves of *Spiranthes spiralis* (Orchidaceae) growing under different ecological conditions. *AKU J Sci Eng* 17:021003:372–376. <https://doi.org/10.5578/fmbd.58663>
- Aybeke M, Sezik E (2010) Vegetative anatomy of some *Ophrys*, *Orchis* and *Dactylorhiza* (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. *Flora* 205:73–89. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.11.009>
- Buyun LI (2013) Adaptive changes of leaf surface of tropical orchid *Cattleya gaskelliana* (N.E.Br.) B.S. Williams after transferring from *in vitro* to *ex vitro* condition. *Modern Phytomorphol* 3:293–296.
- Chen X, Gale SW, Cribb PJ (2009) *Flora of China*. Genus 73. *BLETILLA* 25:209–210. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=104100
- Chen ZY, Chen SH, Chen CH, Chou PY et al (2020) Polysaccharide extracted from *Bletilla striata* promotes proliferation and migration of human tenocytes. *Polymers* 12(11):2567. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123693>
- Ennajeh M, Vadel AM, Cochard H, Khemira H (2010) Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *J Hort Sci Biotechnol* 85(4):289–294. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512670>
- Gao Y, Cai C, Yang Q et al (2022) Response of *Bletilla striata* to drought: effects on biochemical and physiological parameter also with electric measurements. *Plants* 11(17):2313. <https://doi.org/10.3390/plants11172313>
- Gou K, Li Y, Qu Y, Li H et al (2022) Advances and prospects of *Bletilla striata* polysaccharide as promising multifunctional biomedical materials. *Materials & Design* 223:111198. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111198>

- Hazarika BN (2003) Acclimatization of Tissue-Cultured Plants. *Cur Sci* 85:1704–1712
- He JJ, Liang Y-K (2018) *Stomata*. eLS. John Wiley & Sons <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026526>
- He X, Wang X, Fang J et al (2017) *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 195:20–38. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.026>
- Hetherington A, Woodward F (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424:901–908. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
- Hikosaka K, Noguchi K, Terashima I (2016) Modeling leaf gas exchange. In: Hikosaka K, Niinemets Ü, Anten N (eds) *Canopy photosynthesis: from basics to applications*. *Adv Photosynth R et al* (2016) Composition and diversity of endophytic bacteria in *Bletilla striata*. *J South Agric* 47(2):227–233. http://journal11.magtechjournal.com/Jwk_jcyxylc/EN/Y2021/V41/I7/941
- Hu B, Yang H, Chen G, Sun X et al (2022) Structural characterization and preventive effect on non-alcoholic fatty liver disease of oligosaccharides from *Bletilla striata*. *Food & Function* 13(8):4757–4769. <https://doi.org/10.1155/2021/6684120>
- Ji X, Yin M, Nie H, Liu Y (2020) A review of isolation, chemical properties, and bioactivities of polysaccharides from *Bletilla striata*. *BioMed Res Inter*. <https://doi.org/10.1155/2020/5391379>
- Jiang G, Wang B, Wang Y, Kong H et al (2023) Structural characteristics of a novel *Bletilla striata* polysaccharide and its activities for the alleviation of liver fibrosis. *Carbohydr Polymers* 313:120781. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120781>
- Krugliak YM (2018) The investigation *Deutzia* Thunb. Genus stomata in relation with their drought resistance in condition of the northern part of the Forest-Steppe of Ukraine. *Fiziol Rast Genet* 50(5):419–426
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ et al (2001) Plant development: signals from mature to new leaves. *Nature* 411:154. <https://doi.org/10.1038/35075660>
- Li M, Ding B, Huang W et al (2018) Induction and Characterization of Tetraploids from Seeds of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. *BioMed Res Inter* 5:1–8 <https://doi.org/10.1155/2018/3246398>
- Li XY, Yu XY, Huang X (2021a) *Bletilla striata* polysaccharide up-regulates the expression of tight junction protein occludin in intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis. *Basic Clin Med* 41(7):941
- Li Y, Ma Z, Yang X, Gao Y et al (2021b) Investigation into the physical properties, antioxidant and antibacterial activity of *Bletilla striata* polysaccharide/chitosan membranes. *Int J Biol Macromol* 182:311–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.037>
- Liu C, Dai KY, Ji HY, Jia XY et al (2022) Structural characterization of a low molecular weight *Bletilla striata* polysaccharide and antitumor activity on H22 tumor-bearing mice. *Int J Biol Macromol* 205:553–562. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.073>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum (Kbh.)* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pompelli MF, Martins SC, Celin EF et al (2010) What is the influence of ordinary epidermal cells and stomata on the leaf plasticity of coffee plants grown under full-sun and shady conditions? *Braz J Biol* 70(4):1083–1088
- Singh H (1981) Development and organization of stomata in Orchidaceae. *Acta Bot Ind* 9:94–100
- Terashima I, Araya T, Miyazawa S et al (2005) Construction and maintenance of the optimal photosynthetic systems of the leaf, herbaceous plant and tree: an eco-developmental treatise. *Ann Bot* 95(3):507–519. <https://doi.org/10.1093/aob/mci049>
- Wang B, Zhang H, Chen L, Mi Z et al (2020) Extraction, purification, and determination of the gastroprotective activity of glucomannan from *Bletilla striata*. *Carbohydr Polymers* 246:116620. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116620>
- Wu Y, Xiao S, Qi J et al (2022). *Pseudomonas fluorescens* BsEB-1: an endophytic bacterium isolated from the root of *Bletilla striata* that can promote its growth. *Plant Sign Behav* 17(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2100626>
- Xiang J, Wang Y, Yang L, Zhang X et al (2022) A novel hydrogel based on *Bletilla striata* polysaccharide for rapid hemostasis: Synthesis, characterization and evaluation. *Int J Biol Macromol* 196:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.166>
- Zhu Z, Liang T, Dai G, Zheng J et al (2023) Extraction, structural-activity relationships, bioactivities, and application prospects of *Bletilla striata* polysaccharides as ingredients for functional products: A review. *Int J Biol Macromol*: 125407 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125407>

Надійшла в редакцію 02.05.2024
Після доопрацювання 27.05.2024
Прийнята до друку 18.09.2024