

ЛЕВЧИК Н.Я.¹✉, РАХМЕТОВ Д.Б.¹, ЛЕВОН В.Ф.¹, ЛЮБІНСЬКА А.В.¹, САПСАЙ В.І.², КЛИМЧУК Д.О.²

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Україна, 01014, м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1, e-mail: levchuk@ukr.net

² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Україна, 01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2, e-mail: microscopy.botany@gmail.com

✉ levchuk@ukr.net, (098) 903-74-08

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЇ ТА СТРЕСОСТІЙКОСТІ РОСЛИН *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI ЗАЛЕЖНО ВІД ФОРМ ТА УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

Стевія (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) – одна з найцікавіших корисних та наймолодших сільськогосподарських рослин сучасності. Стевія – багаторічний напівчагарник заввишки понад 70 см, належить до порядку *Compositales*, родини *Asteraceae* [1, 2], походженням із Північної та Південної Америки. Сьогодні завдяки унікальним харчовим та лікувальним властивостям вона вирощується з комерційною метою в багатьох частинах Бразилії, Парагваю, Уругваю, Центральної Америки, Ізраїлю, Таїланду і Китаю. Невдовзі вона може стати промисловою альтернативою традиційному буряковому та тростиновому цукру [3, 4]. В Україні рослина набула певної популярності як замітник цукру та біологічно активна добавка в лікувальному та дієтичному харчуванні. Оскільки наукова робота з інтродукції та акліматизації рослин наразі триває, проблеми, що пов'язані з її культивуванням та широким впровадженням, залишаються невирішеними. Метод вирощування та розмноження *in vitro* став

альтернативним і можливим, незалежно від змін пір року, для культивування рослин *S. rebaudiana* в кліматичних умовах України.

Звісно, що умови *in vitro* неодмінно впливають на фізіологічний стан рослин, можливо, на морфологічні параметри та характер накопичення як первинних, так і вторинних метаболітів, а також на стійкість рослин у цілому. Тому метою нашої роботи стало вивчення особливостей морфології мікроструктури листової поверхні рослин *S. rebaudiana*, характеру перебігу фізіологічних процесів та накопичення вторинних метаболітів залежно від умов вирощування (відкритий та захищений ґрунт, умови *in vitro*) і впливу на адаптаційну здатність та стресостійкість економічно цінних інтродуцентів *S. rebaudiana*.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були рослини *Stevia rebaudiana* колекції нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України трьох форм: 3Т, St5, R100 (рис. 1), що вирощуються в умовах відкритого ґрунту та *in vitro*. Мікродослідження листової поверхні рослин *S. rebaudiana* проведено на електронному скануючому мікроскопі GSM-6060 LA фірми GAOL (Японія) лабораторії електронної мікроскопії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Оцінку ступеня посухостійкості проводили згідно зі шкалою оцінки параметрів водного режиму листків, розробленою науковцями Павлівської дослідної станції ВІР (табл. 1) [5]. Якісний та кількісний аналіз амінокислот за Ю.А. Овчинниковою (1974) [6] та Т.Д. Козаренком (1975) [7], вміст флавоноїдів у перерахунку на рутин визначали згідно з методикою В.Ю. Андрєєвої та Г.І. Калініної (2000) [8].



A

B

Рис. 1. *Stevia rebaudiana*: A – форма R100; B – форма 3Т

Таблиця 1

Шкала оцінки параметрів водного режиму листків для визначення відносної посухостійкості, %

Оцінка посухостійкості	Оводненість листків	Водний дефіцит	Втрата вологи листям після зів'янення	Середня втрата води за 1 год. зів'янення
Низька	≤ 59,9	≥ 20,1	≤ 50,1	≥ 11,1
Середня	60,0–69,9	10,1–20,0	30,1–50,0	10,1–11,0
Висока	≥ 70,0	≤ 10,0	≤ 30,0	≤ 10,0

Результати та обговорення

Унаслідок порівняльного дослідження поверхні листків *S. rebaudiana in vivo* та *in vitro* було виявлено, що умови культивування суттєво впливають на морфологічні особливості мікроструктури листової поверхні рослин. Зокрема, умови культивування *in vitro* спричинюють збільшення розмірів продохів та їх кількості на одиницю площі листової поверхні в порівнянні з рослинами, що вирощуються в умовах відкритого та закритого ґрунту (рис. 2).

Листки *S. rebaudiana* гіпостоматичні з хаотичним розташуванням продохів на поверхні. В умовах *in vitro* серед досліджених форм *S. rebaudiana* найбільший розмір продохів завдовжки 43,29±1,12 μm і завширшки 31,17±2,36 μm та найменша їх кількість 110,83±11,45 шт./мм² властива для *S. rebaudiana* форми 3Т. Найменший розмір продохів завдовжки 18,96±0,59 μm, завширшки 11,85±1,13 μm та найбільша їх кіль-

кість 224,2±25,65 шт./мм² – для *S. rebaudiana* форми St5 (табл. 2).

Крім того, в умовах *in vitro* розміри продохів значно збільшуються в порівнянні з рослинами *in vivo*. Зокрема, у *S. rebaudiana* R100 на 37,0% завдовжки та 44% завширшки, у форми 3Т на 60,6% завдовжки та 73,7% завширшки, а також у форми St5 відповідно на 9,97 та 31,05%. Щільність продохів на 1 мм² збільшується на 10% у форми R100, на 34% у форми 3Т та на 73% у форми St5.

Варто зазначити, що кількість продохів по краю листової пластинки у досліджуваних форм *S. rebaudiana* більша приблизно в 2 рази, ніж в її середній частині. Для адаксіальної поверхні листка *S. rebaudiana*, незалежно від форми, характерні поодинокі продохи, вийчасте та залозисте опушення. Крім того, на абаксіальній поверхні *S. rebaudiana* St5 спостерігається восковий наліт.

Отже, за результатами порівняльного анатомо-стоматографічного дослідження поверхні

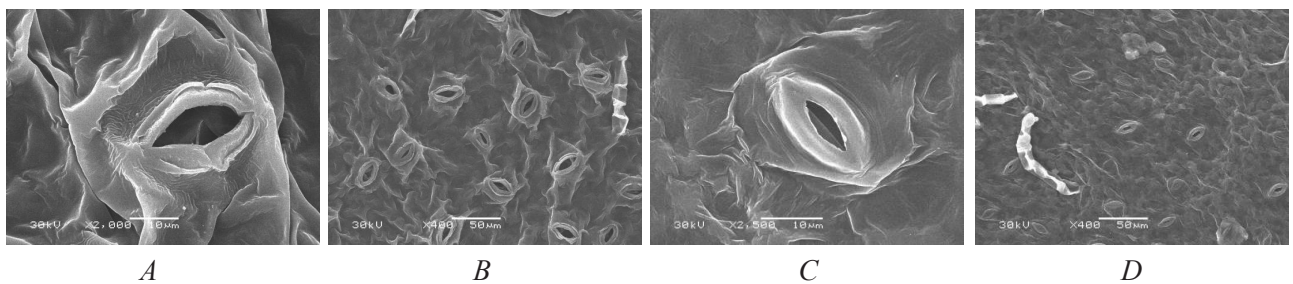


Рис. 2. Ультраструктура поверхні епідермісу листової пластинки *S. rebaudiana* R100: A, B – *in vitro*; C, D – *in vivo*

Таблиця 2

Біометричні параметри продохових клітин абаксіальної поверхні листка *S. rebaudiana*

Форма	Умови вирощування					
	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>		
	довжина продохів, μm	ширина продохів, μm	кількість продохів, шт./мм ²	довжина продохів, μm	ширина продохів, μm	кількість продохів, шт./мм ²
R100	30,91±0,10	18,07±1,02	217,23±9,23	19,51±1,22	10,19±0,46	195,07±5,12
3Т	43,29±1,12	31,17±2,36	110,83±11,45	17,05±1,16	8,20±0,79	72,00±10,13
St5	18,96±0,59	11,85±1,13	224,20±25,65	17,07±1,11	8,17±0,72	59,64±8,29

листіків рослин трьох форм *S. rebaudiana* встановлено, що за тривалого культивування рослин в умовах *in vitro* розмір та кількість продихів збільшуються, що безпосередньо впливає на перебіг та інтенсивність газообмінних процесів у рослин, на характер накопичення як первинних, так і вторинних метаболітів і рівень їх посухостійкості в цілому.

Адаптаційні зміни у рослин-інтродуцентів відбуваються поетапно на субклітинному, клітинному, тканинному та організменному рівнях у цілому. Крупним змінам метаболізму та структури організму в екстремальних умовах передують зміни в клітинах рослин. Адаптаційні процеси клітини тісно пов'язані з водним режимом та вмістом води в клітині [9]. А структура та поведінка продихового апарату протидіє зневоднюючому впливу посухи, визначаючи водоутримувальну здатність клітин [10], що є неодмінною характерною ознакою посухостійкості рослин.

У результаті визначення водоутримувальної здатності тканин листків *S. rebaudiana* встановлено, що ґрунтові рослини, незалежно від форм, під час посухи втрачають вологу поступово і в підсумку на 20–25% менше, ніж рослини, що ростуть *in vitro* на агаризованому середовищі (табл. 3)

Крім того, культуральні рослини *S. rebaudiana* 3Т та *S. rebaudiana* St5 втрачають основний об'єм, а *S. rebaudiana* R100 – весь об'єм вологи протягом перших двох годин висушування. Рослини, що вирощуються в ґрунтових умовах, характеризуються вищим рівнем водоутримувальної здатності, є більш посухостійкими в порівнянні з рослинами *in vitro*. Із досліджених форм найбільша водоутримувальна здатність, незалежно від умов культивування, встановлена у *S. rebaudiana* R100, найменша – у *S. rebaudiana* 3Т.

За шкалою оцінки параметрів водного режиму листків та визначення відносної посухостійкості рослини *S. rebaudiana* в посушливих умовах, незалежно від форм та умов вирощування, втрачають після зів'язнення $\geq 50,1\%$ вологи, що свідчить про їх низьку посухостійкість. Тому регулярне поливання є обов'язковою умовою успішного культивування рослин *S. rebaudiana*.

Підвищення вмісту амінокислоти проліну є одним із первинних неспецифічних процесів, що відбуваються в клітинах рослин під дією стресових факторів, до переліку яких належить і посуха. Пролін відіграє протекторну роль, може утворювати агрегати, які поводять себе як гідрофільні колоїди та сприяють утриманню води в клітині [11, 12]. Рівень проліну, що є показником стресостійкості рослин, показав, що серед рослин відкритого ґрунту найстійкішими до дії стресових факторів виявилися рослини *S. rebaudiana* R100 із вмістом проліну 20,52 мкмоль/л, середньостійкими *S. rebaudiana* St5 із вмістом проліну 11,53 мкмоль/л та найменш стійкими *S. rebaudiana* 3Т із вмістом проліну 10,13 мкмоль/л. Важливо підсумувати, що у невеликих дозах повторювані стреси приводять до загартування організму рослини, крім того, загартування до одного стресу сприяє підвищенню стійкості організму і до інших пошкоджуючих факторів.

Вміст вторинних метаболітів у листках рослин *S. rebaudiana*, серед яких вагоме місце у визначенні стресостійкості рослин займають флавоноїди, також варіює залежно від умов культивування. Найменший вміст флавоноїдів $0,71 \pm 0,01$ мг/г сухої речовини у рослинах, вирощених *in vitro*, найбільший вміст $1,53 \pm 0,02$ мг/г – у рослин, що росли в теплиці, середні показники $0,90 \pm 0,02$ мг/г зафіксовано у рослин, вирощуваних на дослідних ділянках. За нашими дослідженнями, що

Таблиця 3

Водоутримуюча здатність тканин *S. rebaudiana*

Форми та умови культивування	Водоутримуюча здатність, втрата води					
	експозиція					
	2 год.	4 год.	6 год.	24 год.	середня за 1 год.	оцінка посухостійкості
R100 <i>in vivo</i>	15,45±0,66	24,24±1,35	30,47±2,03	61,01±2,14	2,54±0,09	низька
R100 <i>in vitro</i>	82,83±0,90	84,27±0,86	78,53±1,03	81,59±0,86	3,40±0,04	низька
3Т <i>in vivo</i>	25,88±1,90	37,18±2,37	44,27±2,19	69,91±0,81	2,91±0,03	низька
3Т <i>in vitro</i>	70,16±1,76	82,47±0,29	84,75±0,34	87,71±0,20	3,65±0,01	низька
St5 <i>in vivo</i>	16,57±0,37	25,79±0,11	32,28±0,14	62,34±0,06	2,60±0,01	низька
St5 <i>in vitro</i>	75,46±1,49	86,44±0,41	84,47±0,64	87,29±0,51	3,64±0,02	низька

підтверджуються літературними даними, виявлено пряму залежність між рівнем вологозабезпечення рослин протягом вегетації та кількістю накопичених ними флавоноїдів. Підвищений вміст флавоноїдів у тепличних рослин *S. rebaudiana* можна пояснити впливом одночасно двох факторів: недостатнім рівнем штучного освітлення в теплиці, що провокує стресовий стан рослин, та достатнім рівнем вологозабезпечення внаслідок штучного поливу, що є необхідною передумовою синтезу флавоноїдів.

Висновки

Встановлено, що розмір та щільність продихів у рослин *S. rebaudiana* можуть бути використані як біологічний маркер адаптаційної здатності та стійкості рослин в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Виявлено, що водоутримуюча здатність листків *S. rebaudiana* в цілому є показником низької посухостійкості рослин в умовах інтродукції. Рослинам відкритого ґрунту притаманний ви-

щий рівень посухостійкості, що характеризується меншою кількістю втраченої води протягом більш тривалого часу. Із досліджених форм найбільша водоутримуюча здатність, незалежно від умов культивування, встановлена у *S. rebaudiana* R100, найменша – у *S. rebaudiana* 3Т.

Встановлено, що найвищий рівень стресостійкості за рівнем проліну у рослин *S. rebaudiana* R100, найнижчий – у *S. rebaudiana* 3Т.

Виявлено пряму кореляцію між рівнем накопичення флавоноїдів та рівнем вологозабезпечення рослин *S. rebaudiana in vivo*. Флавоноїди, вміст яких постійно змінюється залежно від зовнішніх умов, дають можливість рослині-інтродукценту максимально пристосуватися до умов інтродукції. Встановлено тенденцію до накопичення більшої кількості флавоноїдів у рослин *S. rebaudiana*, що вирощуються у ґрунтових умовах при достатньому рівні вологозабезпечення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гулько Р. Словник лікарських рослин світової медицини латинською і шістьма слов'янськими мовами. Латинсько-українсько-російсько-болгарсько-словацько-польсько-чеський. – Львів: Ліга-Прес, 2007. – 443 с.
2. Методика проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС-ТЕСТ). Лікарські та ефіроолійні / За наук. ред. С.О. Ткачик. – К.: Нілан-ЛТД, 2014. – 852 с.
3. Ahmed B., Hossain M., Islam R., Kumar Saha A., Mandal A. A review on natural sweetener plant – Stevia having medicinal and commercial importance // Agronomski Glasnik. – 2011. – № 1, 2. – P. 75–91.
4. Madan S., Ahmad S., Singh S.N., Kohli K., Kumar Y., Singh R., Carg M. Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. – A Review // Ind. J. Natural Products and Resources. – 2010. – 1, № 3. – P. 267–286.
5. Добренюкова Л.Г. Засухоустойчивость сортов земляники ананасной в условиях северо-запада РСФСР и Краснодарского края. – Л.: Каталог мировой коллекции ВИР, 1989. – Вып. 502. – 20 с.
6. Овчинников Ю.А. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М.: Мир, 1974.
7. Козаренко Т.Д. Ионнообменная хроматография аминокислот. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1975.
8. Андреева В.Ю., Калинина Г.И. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. // Химия растительного сырья. – 2000. – № 1. – С. 85–88.
9. Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. – М.: Наука, 1982. – 280 с.
10. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Учеб. пособие. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 2011. – 235 с.
11. Малиновский В.И. Физиология растений. Учеб. пособие. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2004. – 106 с.
12. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин: Підручник. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 392 с.

LEVCHYK N.YA.¹, RAKHMETOV D.B.¹, LEVON V.F.¹, LIYBINSKA A.V.¹, SAPSAI V.I.²,
KLYMCHUK D.O.²

¹ M.M. Gryshko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv, 01014, Timiryazevska str., 1, e-mail: levchyk.n@ukr.net

² M.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv, 01601, Tereshchenkivska str., 2

PECULIARITIES OF MORPHOLOGY AND STRESS-RESISTANCE OF PLANTS *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI DEPENDENT ON FORMS AND GROWING CONDITIONS

Aim. Study of leaf surface morphology microstructure peculiarities of plants *Stevia rebaudiana*, character of water-holding capacity dependent on growing conditions (open soil and *in vitro*) and influence on adaptation abilities of economically valuable introduced plants. **Methods.** Microexamination of leaf surface on microscope GAOL, GSM-6060 LA. Evaluation of tissue water-holding ability, qualitative and quantitative analysis of amino acids. **Results.** *In vitro* conditions *Stevia rebaudiana* 3T plant shows the biggest size of stomas (long $43.29 \pm 1.12 \mu\text{m}$, wide $31.17 \pm 2.36 \mu\text{m}$) and the smallest quantity of them (110.83 ± 11.45 pieces/ mm^2). *Stevia rebaudiana* St5 plant shows the smallest size of stomas (long $18.96 \pm 0.59 \mu\text{m}$, wide $11.85 \pm 1.13 \mu\text{m}$) and the biggest quantity of them (224.2 ± 25.65 pieces/ mm^2). After the transference into the cultural conditions, the stomas' size of these plants' form increase on 37% in long and 44% in wide and number of stomas on abaxial surface increase on 10%. It was found that plants *Stevia rebaudiana* from open soil, regardless of forms, during drought to lose humidity gradually and, as a result, 20–25% less than plants cultivated in agar medium. *Stevia rebaudiana* R100 has the biggest water-holding ability and the highest level of proline, regardless of cultivations conditions, *Stevia rebaudiana* 3T – the smallest one. **Conclusions.** Cultivation conditions of *Stevia rebaudiana* plants have direct impact on peculiarities of leaf surface morphology structure, by increasing size and quantity of stomas. *Stevia rebaudiana* plants in introduction conditions have low level of drought-resistance. Open soil plants are more drought-resistance, than plants cultivated *in vitro*. *Stevia rebaudiana* R100 plants have the highest level of drought- and stress-resistance among investigated forms, *Stevia rebaudiana* 3T – the smallest one.

Keywords: stomas, *Stevia rebaudiana*, water-holding ability, proline, drought-resistance.