

УДК 581.143

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ТРИХОМОВ ИНТАКТНЫХ И IN VITRO РАСТЕНИЙ *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI В СВЯЗИ С ОБРАЗОВАНИЕМ И НАКОПЛЕНИЕМ СТЕВИОЛ-ГЛИКОЗИДОВ

Н.И. Бондарев¹, М.А. Суханова¹, Г.А. Семенова²,
О.В. Горяева, С.Е. Андреева, А.М. Носов

(кафедра физиологии растений; e-mail: nikhbond@inbox.ru)

С помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии исследована ультраструктура трихомов интактных и in vitro растений стевии. Как на верхней, так и на нижней поверхности листьев обнаружены три типа трихомов: железки округлой формы, а также крупные и мелкие волоски. На поверхности верхних листьев плотность трихомов выше, чем на поверхности нижних листьев, а у растений in vitro ниже, чем у интактных растений. Отмечена положительная корреляция между числом железок на листьях и уровнем содержания в них стевииол-гликозидов (СГ). Были выявлены три основные стадии онтогенеза клеток железки, которые отражают последовательность накопления секрета.

Ключевые слова: трихом, ультраструктура клеток железки, число железок, содержание стевииол-гликозидов.

Как известно, *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) является источником стевииол-гликозидов (СГ) — низкокалорийных высокоосладких соединений с уникальными свойствами [1—3]. Основным местом накопления СГ являются листья. В них может накапливаться от 4 до 15% СГ, тогда как в других органах растения (стебли, цветки, семена, корни) значительно меньше [4—8]. Ранее было выяснено, что все надземные части стевии покрыты трихомами [9, 10]. Однако исследования по эпидермальным образованиям стевии единичны и были проведены без использования электронной микроскопии. Некоторые исследователи полагают, что именно в эпидермальных образованиях идет синтез и накопление СГ [11, 12]. Однако никаких доказательств этого факта до настоящего времени не приведено.

Таким образом, целью данной работы было исследование ультраструктуры эпидермальных образований стевии с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии в связи с синтезом и накоплением СГ.

Материалы и методы

Объектами исследования служили интактные и in vitro растения стевии. Подготовку материала для трансмиссионной микроскопии проводили следующим образом. Кусочки листьев фиксировали при 20° в течение 1,2—2 ч в 1,25—2%-м глутаральдегиде, приготовленном на фосфатном буфере с последующей дофиксацией в 1—2%-м растворе OsO₄

или без нее. Затем образцы дегидратировали в растворах этанола восходящей концентрации, после чего контрастировали в 2%-м растворе уранилацетата, в 70%-м этаноле в течение 14 ч при 20°. После этого материал вновь обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне и заключали в эпон. Тонкие срезы с образцов получали на микротоме ЛКВ-III (ЛКВ, Швеция) и ультратоме “Тесла”, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [13]. Просмотр и съемку проводили с помощью электронных микроскопов JEM-7A и JEM-100B (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и рабочем увеличении 5000—20 000.

Образцы для сканирующей микроскопии дегидратировали в растворах этанола восходящей концентрации, вплоть до абсолютного. Затем образцы лиофильно высушивали и приклеивали на столик, на который было проведено напыление тонкого слоя платины. Просмотр и съемку проводили на сканирующем электронном микроскопе Н-600 (“Hitachi”) при ускоряющем напряжении 20 кВ и рабочем увеличении 30—2000.

Результаты и обсуждение

Эпидермис листьев стевии состоит из изодиаметрических клеток, покрытых тонким слоем кутикулы. Клетки верхнего эпидермиса несколько крупнее и очертания их менее извилисты, чем у клеток нижнего эпидермиса. Устьица аномоцитного типа формируются на верхней и нижней сторонах лис-

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва.

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская обл., г. Пушкино.

та, но на нижней стороне их значительно больше. Они располагаются равномерно или небольшими скоплениями. На поверхности листа нами были обнаружены три типа эпидермальных образований (рис. 1, а, б).

1. **Крупные волоски.** Волоски имеют коническую форму, прямые или изогнутые, состоят из 7–10 клеток. Их длина составляет у интактных растений 300–500 мкм, у *in vitro* растений — 120–150 мкм.

2. **Мелкие волоски.** Они более короткие и тонкие по сравнению с крупными волосками, состоят из 5–6 клеток. Длина мелких волосков колеблется от 80 до 150 мкм у интактных и от 60 до 80 мкм у *in vitro* растений.

3. **Железки.** Они имеют округлую форму и располагаются в углублениях листовой поверхности. Диаметр железок у интактных растений составляет 50–60 мкм, у *in vitro* растений — 40–50 мкм.

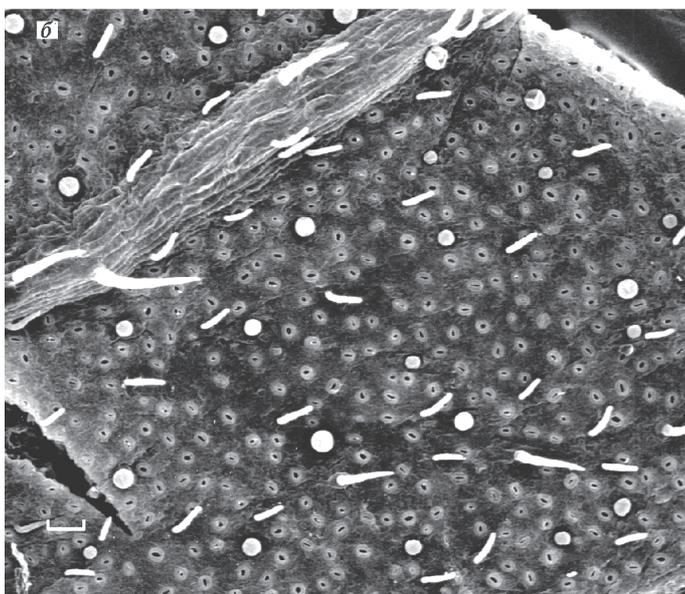
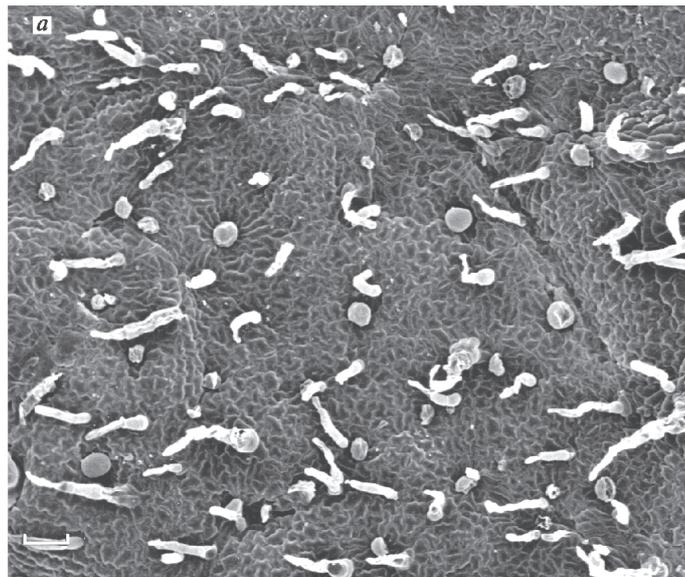


Рис. 2. Адаксиальная (а) и абаксиальная (б) сторона листовой пластинки *S. rebaudiana*. Масштабная линейка — 100 мкм

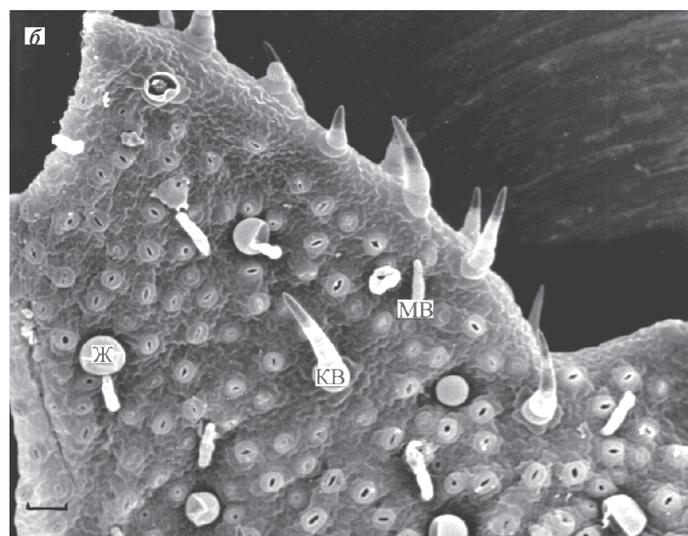


Рис. 1. Три типа трихом на поверхности листьев *S. rebaudiana*: а — интактное растение; б — растение *in vitro*. КВ — крупный волосок, МВ — мелкий волосок, Ж — железка. Масштабная линейка — 50 мкм

У растений *in vitro* (рис. 1, б) число железок примерно в 1,5–2 раза меньше, чем у интактных растений. Это положительно коррелирует с содержанием СГ в листьях растений *in vitro* [7, 14].

Все три типа трихомов обнаружены как на адаксиальной (рис. 2, а), так и на абаксиальной (рис. 2, б) поверхности листьев. На поверхности молодых верхних листьев железок и волосков больше, чем на поверхности нижних стареющих листьев. Ранее нами было установлено, что в верхних листьях содержание СГ в 1,5–2 раза выше, чем в нижних [8], т.е. и в этом случае наблюдали положительную корреляцию между плотностью железок и содержанием СГ.

Апикальная часть железки, выступающая на поверхности листа, состоит из двухрядно располо-

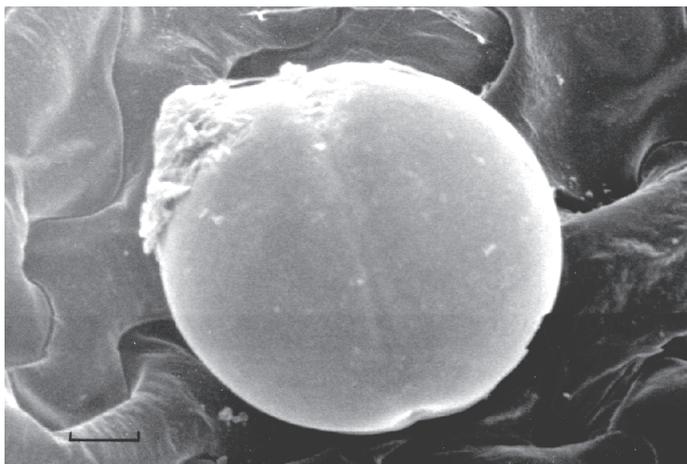


Рис. 3. Зрелая железа с заполненной субкутикулярной полостью на поверхности листа *S. rebaudiana*. Масштабная линейка — 10 мкм

женных клеток. В этой части железы имеется субкутикулярная полость, которая может заполняться секретом (рис. 3).

Ранее было отмечено [12], что чем южнее находился район возделывания, тем большее число трихом и железок образуется на листе. При этом в листьях накапливалось большее количество СГ [12, 15]. Следовательно, согласно полученным в нашей работе результатам и данным литературы, существует положительная корреляция между количеством железок на листьях и уровнем содержания в них СГ. Отсюда можно сделать предположение о роли этих структур в образовании и накоплении СГ. Железки, расположенные на поверхности репродуктивных органов, несколько отличаются от подобных образований на поверхности листьев. Так, последние более крупные и находятся в углублениях.

Для того чтобы попытаться ответить на вопрос о локализации процессов биосинтеза и накопления СГ, мы провели исследование ультраструктуры клеток железок с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. На рис. 4 изображена продольно разрезанная железа, находящаяся в фазе созревания.

Железки состоят, как правило, из восьми двурядно расположенных клеток (рис. 4, а, б). Размеры клеток в апикальной части железы несколько больше, чем в базальной. Ультраструктура клеток железки, начиная с ее базальной части и заканчивая апикальной, сильно меняется. Поэтому клетки железки можно условно разделить на три группы. К первой группе относятся клетки с типичной ультраструктурой и активным метаболизмом. Они находятся в базальной части железы. Ко второй группе принадлежат клетки на начальных ступенях деструкции и соответственно со сниженной функциональной активностью. Эти клетки распо-

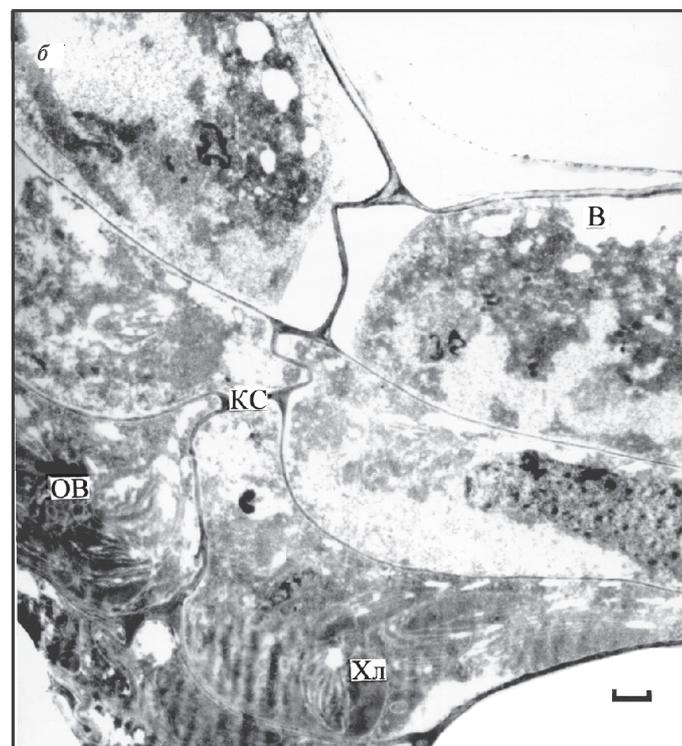
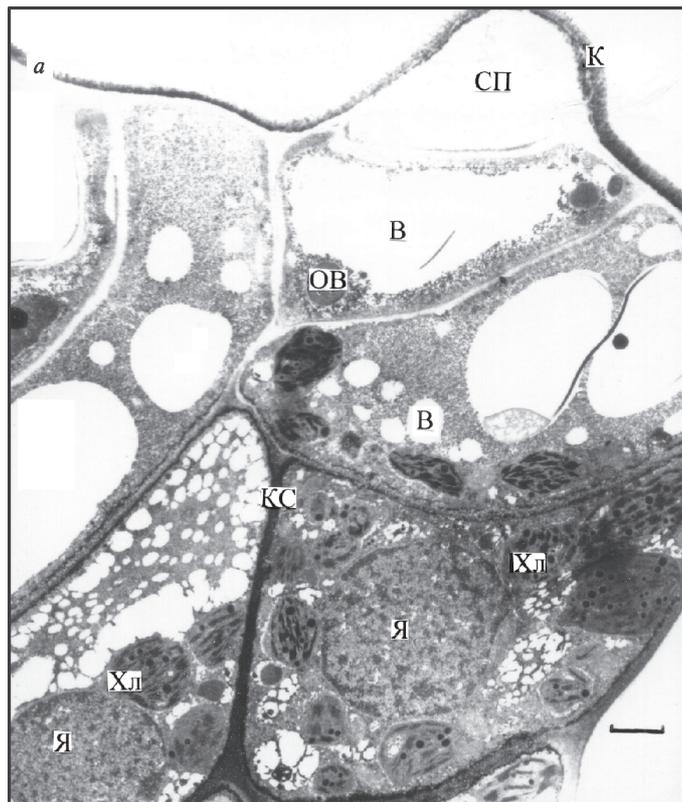


Рис. 4. Ультраструктура клеток железки *S. rebaudiana*. а — фиксация в глутаральдегиде с последующим осмированием; б — фиксация в глутаральдегиде без осмирования. В — вакуоль, К — кутикула, КС — клеточная стенка, ОВ — осмиофильное включение, СП — субкутикулярная полость, Хл — хлоропласт, Я — ядро. Масштабная линейка — 1 мкм

лагаются в средней части железки. К третьей группе относятся практически полностью деструктурированные клетки. Они находятся в апикальной части железки (рис. 4, а). Активно функционирующие клетки содержат крупное ядро, пластидный аппарат, митохондрии и другие органеллы. Для них характерна плотная цитоплазма с небольшими вакуолями округлой и вытянутой формы и электронно-плотными включениями. Они похожи на липидные капли, но отличаются от них зернистой структурой. Вероятно, в этих включениях содержится какой-либо из предшественников биосинтеза дитерпеноидов, о чем мы сообщали ранее [16, 17]. То, что дитерпеноиды могут содержаться в железистых трихомах растений, отмечено у представителей различных семейств, например у *Plectranthus madagascariensis* (Lamiaceae) [18] и *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) [19]. В пристеночном слое цитоплазмы накапливаются осмиофильные мелкозернистые включения. Пластиды, представленные в основном хлоропластами различного размера, лишены наружной мембраны и содержат большое число осмиофильных пластоглобул. Строма пластид электронно-плотная. В тилакоидах гран и стромы обнаружено накопление осмиофильных веществ. Данные характеристики свидетельствуют об активных метаболических процессах, протекающих в пластидах и, вероятно, связанных с синтезом терпеноидов, так как число тилакоидов с электронно-плотным содержимым возрастает при усиленной вегетации одновременно с увеличением содержания СГ [14]. Подобная особенность была отмечена ранее для *Perilla ocymoides* L., Lamiaceae [20]. Эти исследователи обнаружили, что при непрерывном освещении пластиды клеток железки переполнены

осмиофильным содержимым, в то время как короткий 8-часовой день (как и переход к фазе секреции при непрерывном освещении) способствует развитию агранулярного эндоплазматического ретикулума, в котором осуществляется синтез стероидов, а также исчезновению осмиофильного содержимого из пластид и появлению центральных вакуолей с электронно-плотным содержимым. При этом выход эфирного масла при непрерывном освещении был почти на порядок выше, чем на коротком дне [20]. Осмиофильное вещество, содержащееся в тилакоидах пластид стевии, не является тождественным по химическому составу содержимому пластоглобул. Это подтверждается следующим наблюдением. При фиксации листьев стевии лишь в глутаральдегиде без осмирования на месте пластоглобул остается пустое пространство в результате экстракции их содержимого, в то время как содержимое тилакоидов и без осмирования остается электронно-плотным (рис. 5). Помимо этого в цитоплазме и при таком способе фиксации (без осмирования) видны осмиофильные включения неправильной формы, что позволяет их отличить от липидных капель (рис. 4, б). В клетках, где частично начался процесс деструкции, органеллы прижаты к клеточной стенке, а значительный объем клетки занят несколькими крупными вакуолями. Деструктурированные клетки лишены органелл и почти полностью заполнены огромной вакуолью. Очевидно, три типа клеток демонстрируют последовательность накопления секрета в железках, который, возможно, представляет собой смесь дитерпеновых гликозидов, хорошо растворимых в воде. Секрет выделяется из клеток апикальной части и скапливается под кутикулой, которая при этом

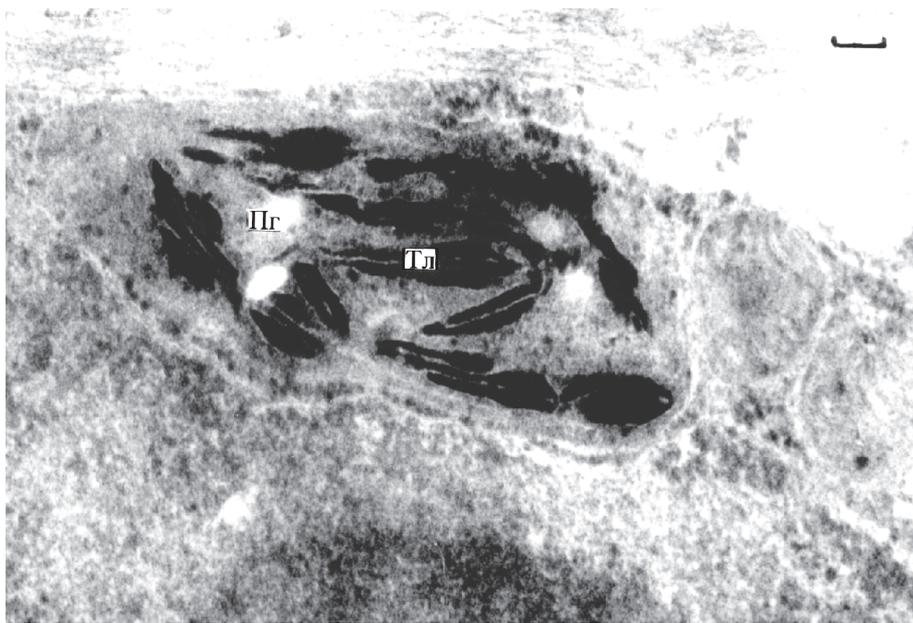


Рис. 5. Ультраструктура хлоропласта *S. rebaudiana*. Пг — пластоглобула (без содержимого), Тл — тилакоид. Масштабная линейка — 0,1 мкм

отделяется от клеточных стенок в 2—3 местах, а затем образуется субкутикулярная полость сферической формы с небольшой перетяжкой посередине (рис. 3, 4). Субкутикулярная полость образуется за счет разделения клеточной стенки, небольшая часть которой отделяется вместе с кутикулой. Кутикула на поверхности железок имеет разную толщину и структуру. Апикальные клетки покрыты кутикулой, толщина которой в несколько раз больше относительно тонкой клеточной стенки, причем кутикула имеет выраженную двуслойность: тонкий светлый наружный слой и более толстый темный внутренний слой. Базальные клетки покрывает тонкий светлый кутикулярный слой, но клеточная стенка этих клеток в 2—3 раза

толще, чем у апикальных (рис. 4, *a*). Такая прочная кутикула обеспечивает целостность субкутикулярной полости и накопление в нем секрета. Однако иногда может происходить повреждение кутикулы и вытекание секрета из такой полости (рис. 1, *b*). Разрывы кутикулы и утечку содержимого железистых трихом наблюдали также и другие исследователи у некоторых видов семейства *Asteraceae* [21]. Встречаются также железки с незаполненными субкутикулярными полостями, хотя кутикула не несет видимых повреждений и вытекания содержимого не наблюдается. У только что сформированных железок верхних молодых листочков ультраструктура клеток железок максимально развита, а затем количество цитоплазмы и органелл постепенно уменьшается, клетки вакуолизируются. Как известно, степень сложности ультраструктурной организации терпеноидогенных клеток коррелирует с интенсивностью процессов синтеза и транспорта секрета [22]. Это согласуется с данными хроматографического анализа о более высоком содержании дитерпеновых СГ в молодых верхних листьях [8].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kinghorn, A.D., Soejarto, D.D. Sweetening agents of plant origin // *Critical Rev. in Plant Sciences*. 1986. Vol. 4. N 2. P. 79—120.
2. Lyakhovkin A.G., Long T.D., Titov D.A., Anh M.P. Cultivation and Utilization of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Hanoi: Agricult. Pub. House, 1993. 44 p.
3. Matsui M., Matsui K., Kawasaki Y., Oda Y., Noguchi T., Kitagawa Y., Sawada M., Hayashi M., Nohmi T., Yoshihira K., Ishidate M., Sofuni T. Evaluation the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays // *Mutagenesis*. 1996. Vol. 11. N 6. P. 573—579.
4. Zaidan L.B.P., Dietrich S.M.C., Felipe G.M. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Jap. J. of Crop Science*. 1980. Vol. 49. P. 569—574.
5. Hsing Y., Su W., Chang W. Accumulation of stevioside and rebaudioside A in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1983. Vol. 24. P. 115—119.
6. Darise M., Kohda H., Mizutani K., Kasai R., Tanaka O. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Agric. Biol. Chem.* 1983. Vol. 47. P. 133—135.
7. Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Plant Science*. 2001. Vol. 161 (1). P. 155—163.
8. Bondarev N., Sukhanova M.A., Reshetnyak O., Nosov A. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its dynamics during ontogenesis // *Biol. Plant*. 2004. Vol. 47. N 2. P. 261—264.
9. Hohmann B. Botanisch-warenkundliche Diagnostik von *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., einer süßstoffliefernden Pflanze // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 1978. Bd. 74. N 8. P. 296—299.
10. Шафферт Е., Чеботарь А., Новикова В. Морфоанатомическая характеристика стевии [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.] в связи с интродукцией на Южном берегу Крыма // *Цитолого-эмбриологические исследования высших растений: Тр. Никитского бот. сада*. Т. 113. Ялта, 1992. С. 25—37.
11. Денисова Г.А. Терпеносодержащие структуры растений. Л.: Наука, 1989. 141 с.
12. Дзюба О.О. Стевия — *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley. Интродукция, морфология, биология, возделывание: Автреф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВНИИ им. Н.И. Вавилова, 1999. 15 с.
13. Reynolds E.C. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 17. P. 208—212.
14. Bondarev N.I., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. Features of development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycoside // *Planta Medica*. 2002. Vol. 68. P. 759—762.
15. Вахрушева Т.Е., Гогичайшвили Н.Б., Горбатенко Л.Е., Дзюба О.О., Талалова Е.Е. Биохимическая характеристика стевии в зависимости от условий выращивания // *Мат-лы II Междунар. симпоз. "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования"*. Т. 2. Пушино, 1997. С. 617—618.
16. Суханова М.А., Бондарев Н.И., Горяева О.В., Андреева С.Е., Носов А.М. Ультраструктурная характеристика клеток растений и каллусных культур *Stevia rebaudiana* в связи с синтезом стевииоли-гликозидов // *Биотехнология*. 2007. Т. 5. С. 51—59.
17. Ladygin V.G., Bondarev N.I., Semenova G.A., Smolov A.A., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production

Заключение

Таким образом, все три типа эпидермальных образований обнаружены как на верхней, так и на нижней поверхности листьев. На поверхности молодых верхних листьев железок и волосков больше, чем на поверхности нижних стареющих листьев. У растений *in vitro* число железок и трихомов на листьях примерно в два раза меньше, чем у интактных растений. Во всех случаях между количеством железок на листьях и уровнем содержания в них СГ отмечали положительную корреляцию. Железки состоят из клеток, находящихся на разных стадиях онтогенеза: живых клеток с активным метаболизмом, клеток на начальных ступенях деструкции и полностью деструктурированных клеток. Вероятно, что три типа клеток демонстрируют последовательность накопления секрета в железках. Интенсивность процессов синтеза и транспорта секрета определяется степенью сложности ультраструктурной организации терпеноидогенных клеток и активностью метаболических процессов, происходящих в них, что согласуется с данными о содержании СГ.

of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* in vivo and in vitro // Biol. Plant. 2008. Vol. 52 (1). P. 9–16.

18. Ascensao L., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Schripsema J., Deans S.G., Scheffer J.C. 1998. *Plectranthus madagascariensis*: Morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity // Int. J. Plant Science. 1998. Vol. 159 (1). P. 31–38.

19. Wagner G.J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs // Plant Physiol. 1991. Vol. 96. P. 675–679.

20. Данилова М.Ф., Кашина Т.К. Структурные основы актиноритмической регуляции цветения. СПб.: Наука, 1999. 218 с.

21. Duke S.O., Paul R.N. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. // Int. J. Plant Science. 1993. Vol. 154. P. 107–118.

22. Васильев А.Е. Функциональная морфология секреторных клеток растений. Л.: Наука, 1977. 208 с.

Поступила в редакцию
23.09.08

MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF TRICHOMES OF THE INTACT AND THE IN VITRO PLANTS *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI IN RELATION TO SYNTHESIS AND ACCUMULATION IN THEM OF STEVIOL GLYCOSIDES

N.I. Bondarev, M.A. Sukhanova, G.A. Semenova, O.V. Goryaeva, S.E. Andreeva, A.M. Nosov

Trichomes present on the leaf surface of both intact and in vitro *Stevia* plants (*Stevia rebaudiana* Bertoni) were examined using scanning and transmission electron microscopy. Three types of trichomes were observed both on adaxial and on abaxial surface of leaves: (a) spherical glands, (b) large hairs, (c) small hairs. The trichomes appeared in higher numbers on the leaf surfaces of the intact plants. The numbers of trichomes seem to be greater on the upper leaves than on the lower leaves. The results of the work provide evidence for positive correlation between number of glands on leaves and their content of the SGs. Three major stages in the development of the gland cells were identified, corresponding to the stages of secret accumulation.

Key words: *trichom, ultrastructure of gland cells, numbers of glands, content of steviol glycosides.*

Сведения об авторах

Бондарев Николай Ильич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИФР РАН. Тел.: (495) 977-94-45, 977-92-22, 903-93-02; e-mail: nikbond@inbox.ru

Суханова Марина Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИФР РАН. Тел.: (495) 977-94-45, 977-92-22; e-mail: mashe_2000@mail.ru

Семенова Галина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел. (4967) 73-37-96; e-mail: 41semga@mail.ru

Горяева Ольга Васильевна — канд. биол. наук, вед. инженер кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-21-18

Андреева Светлана — канд. биол. наук, кафедра физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-21-18

Носов Александр Михайлович — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел.: (495) 939-21-18, 977-92-22; e-mail: al_nosov@mail.ru