

RESEARCH ARTICLE

The features of leaf anatomical structure of some *Rhododendron* species from section *Ponticum*

Nataliia V. Nuzhyna *, Valentyna V. Kondratiuk-Stoyan

Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, S. Peplura str. 1, 01032 Kyiv, Ukraine; * nuzhynan@gmail.com

Received: 24.01.2017 | Accepted: 10.03.2017 | Published: 22.03.2017

Abstract

The article represents a comparative anatomical analysis of leaves of *Rhododendron makinoi*, *R. degronianum*, *R. callimorphum* and *R. brachycarpum*. It was shown that leaves of *R. makinoi* have most pronounced xerophytic features. *R. degronianum* and *R. makinoi* are similar by most of morphometric characteristics, while *R. callimorphum* and *R. brachycarpum* are well distinguishable. However, some quantitative parameters of the leaf with statistically significant difference in *R. makinoi* and *R. degronianum* have been detected and can be used as additional criteria for their taxonomic distinguishing. In general, investigated species differ mostly by type and number of trichomes. The presence of small idioblasts in the studied species was ascertained.

Keywords: *Rhododendron*, *Ponticum*, leaf, anatomy, morphology, idioblasts

Вступ

Рододендрони є надзвичайно цінними декоративними рослинами, що широко використовуються в ландшафтному дизайні. Одними з найбільш цікавих є дослідження таксономічної різноманітності та місцезростань цих рослин. Вивчення представників роду *Rhododendron* L. скероване в першу чергу на вдосконалення агротехнічних підходів до вирощування

цих рослин та дозволяє впроваджувати в інтродукцію нові цінні види та сорти.

Дослідження особливостей будови листка, як одного з найбільш поліфункціональних і пластичних органів рослин дозволяють виявити адаптаційні особливості як окремих видів, так і родів в цілому. Існує чимало наукових напрацювань щодо анатомічних особливостей листків окремих видів рододендронів (Nilsen & Scheckler 2003;

Bondar 2012; Bondar & Zerkal 2013), однак для багатьох представників роду це питання все ще залишається відкритим.

Для нашого дослідження було обрано 4 види роду *Rhododendron* – *R. makinoi* Tagg ex Nakai et Koidz., *R. degronianum* Carrière, *R. callimorphum* Balf. f. & W.W. Sm. та *R. brachycarpum* D. Don ex G. Don., оскільки анатомічна будова листків цих видів в літературі описана недостатньо. Окрім того, існують суперечливі дані в систематиці цих рослин. Зокрема, *R. makinoi* розглядається як самостійний вид (Chamberlain et al. 1996; Walter & Gillett 1998; Goetsch et al. 2005) або підвид *R. yakushmanum* subsp. *makinoi* (Tagg ex Nakai) D.F. Chamb. (Cullen et al. 2011), інколи ж його відносять до складу *R. degronianum* (Krüssmann 1978). Додаткові анатомічні дослідження могли б допомогти з'ясувати дане питання. Отримані дані також можуть бути використані для розробки рекомендацій щодо вирощування цих рослин, а також можуть допомогти у з'ясуванні їх адаптаційного потенціалу.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження були *R. makinoi*, *R. degronianum*, *R. callimorphum* та *R. brachycarpum* з секції *Ponticum* G. Don. підроду *Hymenanthes* (Blume) K. Koch. *R. makinoi*, *R. degronianum* та *R. brachycarpum* належать до підсекції *Pontica* Sleumer, а *R. callimorphum* – до підсекції *Campylocarpa* Sleumer (Chamberlain et al. 1996). Ці види у природі ростуть у різних умовах. Зокрема, *R. brachycarpum* представлений на кам'янистих ділянках серед змішаних лісів Далекого Сходу Росії, в Кореї та Японії, зустрічається на Курилах (Ітуруп, Кунашир), є рідкісним реліктом Приморського краю. *R. makinoi* представлений в горах на висоті 200–700 м н.р.м. на острові Хонсю, Японія. *R. degronianum* родом з північної частини острова Хонсю (Японія), де ці рослини зростають на висоті біля 1800 м н.р.м. Батьківщиною *R. callimorphum* є Китай (Zarubenko 2006).

Для досліджень використовували листки однорічних сіянців рододендронів, котрі зростають у колекційних експозиціях Ботанічного саду імені О.В. Фоміна. Дослідження проводились на однорічних рослинах, що перезимували за ідентичних умов в теплиці та були висаджені в ґрунт навесні. В червні відбирали по два листки середнього ярусу з п'яти рослин кожного виду (в загальному було проаналізовано по 10 листків для кожного з видів). Для кожного морфометричного параметра було проведено по 10 вимірювань на листок (тобто в загальному було здійснено по 100 вимірювань для кожного з параметрів кожного з видів). Додатково було проаналізовано якісні ознаки листків (в першу чергу трихоми) на дорослих екземплярах.

Для анатомічних досліджень брали середню частину листкової пластинки, фіксували в суміші формалін:етилловий спирт:оцтова кислота, заливали її в желатин (Romeys 1954) та за допомогою заморожуючого мікротома виготовляли поперечні зрізи завтовшки 15–20 мкм, які забарвлювали сафраніном. Додатково листки мацерували для детального вивчення адаксіальної та абаксіальної епідерми. При описі епідерми листкової пластинки використовували методики Zakharevich (1954) і Baranova (1985). Вимірювання проводили за допомогою програми ImageJ та окуляр-мікрометра на мікроскопі XSP-146TR.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 8.0, достовірність результатів визначали за *t*-критерієм Стьюдента. Фотографії виготовляли за допомогою цифрової камери Canon Power Shot A630.

Результати та їх обговорення

Однорічні листки досліджених видів в цілому мають подібну анатомічну будову: дорзовентральні, гіпостоматичні, вкриті одношаровою епідермою, продиховий апарат аномоцитного типу оточений переважно

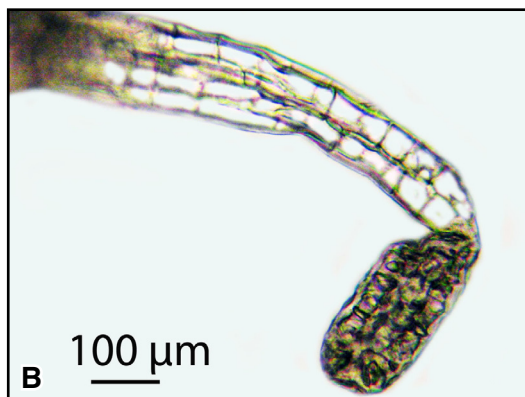
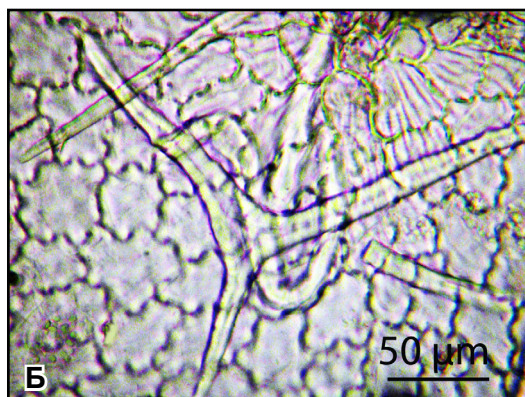
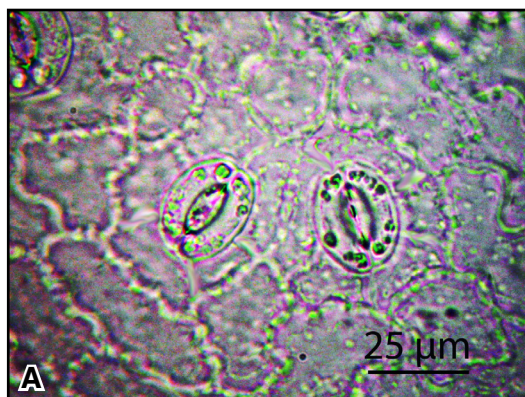


Рис. 1. Епідерма листка: **А** – продихи абаксiальної епiдерми *Rhododendron degronianum*; **Б** – незалозиста трихома *R. callimorphum*; **В** – залозиста трихома *R. callimorphum*.

Fig. 1. Leaf epidermis: **A** – stomata of the abaxial epidermis of *Rhododendron degronianum*; **Б** – non-glandular trichome of *R. callimorphum*; **В** – glandular trichome of *R. callimorphum*.

п'ятьма клітинами (Рис. 1 А). Продихи дещо припідняті над поверхнею епiдерми. Обриси епiдермальних клітин абаксiальної сторони звивисті та звивисто-хвилясті, з адаксiальної сторони – хвилясті. Проекція площі епiдермальних клітин розпластана.

За типом трихом та їх розміщенням дані види iстотно відрізняються. Листкова пластинка *R. takinoi* з абаксiального боку густо вкрита довгими одноклітинними та розгалуженими незалозистими трихомами (Рис. 2 А, Б), тоді як з адаксiального боку лише на крупних жилках можна побачити одноклітинні прості трихоми. Листки *R. degronianum* мають поодинокі одноклітинні короткі трихоми з абаксiальної сторони та окремі трихоми вздовж крупних жилок (Рис. 2 В). Листки *R. callimorphum* вкриті довгими розгалуженими трихомами з обох боків (Рис. 1 Б). На листках *R. callimorphum* присутні залозисті

трихоми з багатоклітинною ніжкою та багатоклітинною голівкою з адаксiального боку та по краю листкової пластинки, в меншій кількості – з абаксiального боку (Рис. 1 В; Рис. 2 Г). Такі залозисті трихоми характерні лише для даного виду з-посеред досліджених. За літературними даними, такі залозисті та розгалужені незалозисті трихоми характерні видам саме підроду *Hymenanthes* (Нуам 2010). Листки *R. brachycarpum* вкриті довгими нитчастими одноклітинними трихомами лише вздовж центральної жилки з обох боків листка та по краю листкової пластинки (Рис. 2 Д).

Варто відмітити, що у дорослих рослин щільність трихом дещо збільшується відносно однорічних екземплярів. Найбільші відмінності виявлені у *R. degronianum*, в дорослому віці їх листки мають поодинокі довгі трихоми з адаксiального боку та щільний покрив з довгими розгалуженими та

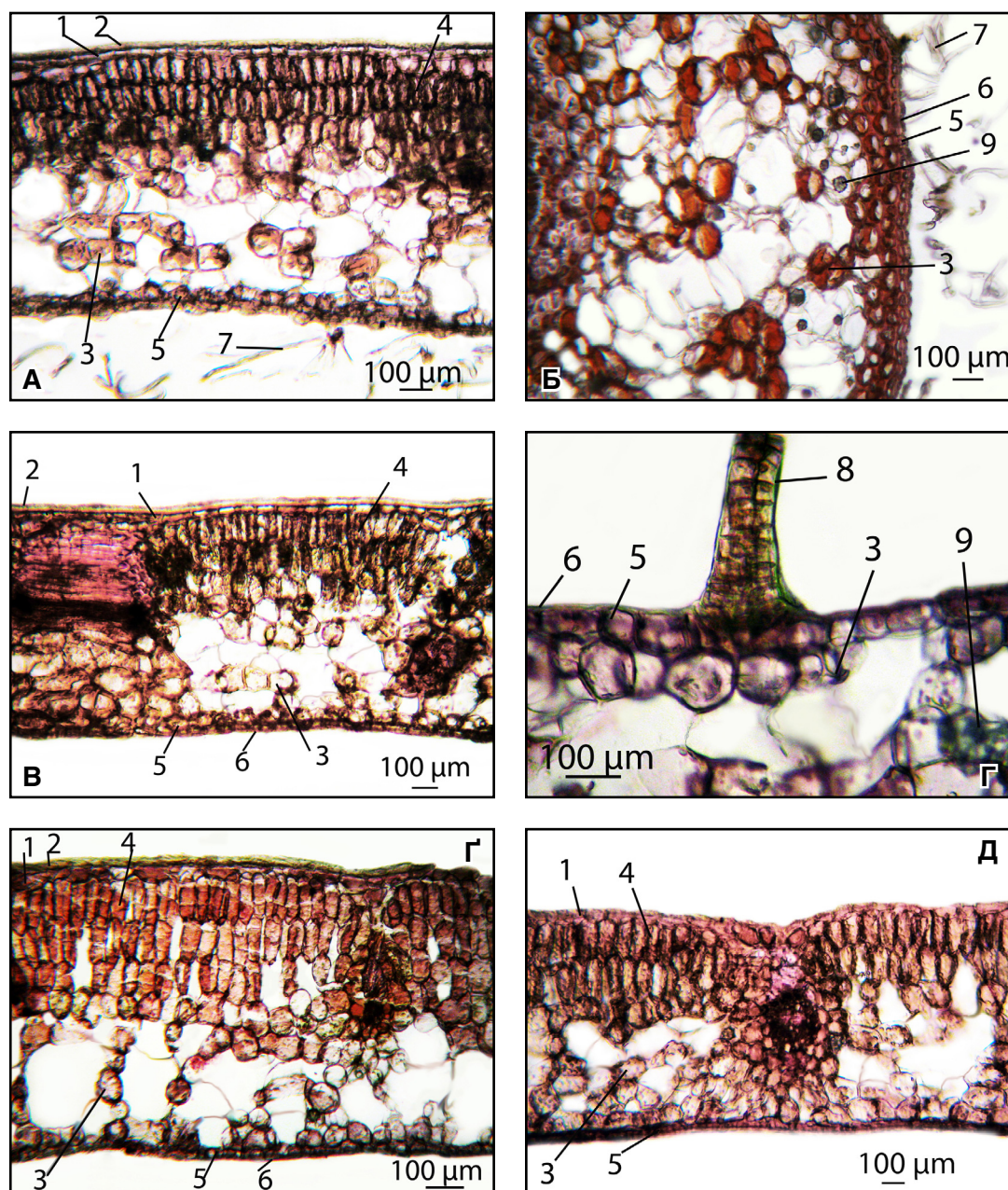


Рис. 2. Поперечний переріз листової пластинки: **А** – *Rhododendron makinoi*; **Б** – в районі центральної жилки *R. makinoi*; **В** – *R. degronianum*, **Г, Г** – *R. callimorphum*; **Д** – *R. brachycarpum*. 1 – адаксіальна епідерма; 2 – кутикула адаксіальної епідерми; 3 – губчастий мезофіл з клітинами-ідіобластами; 4 – стовпчастий мезофіл; 5 – абаксіальна епідерма; 6 – кутикула абаксіальної епідерми; 7 – проста трихома; 8 – залозиста трихома; 9 – включення оксалату кальцію.

Fig. 2. Cross-section through the leaf blade: **A** – *Rhododendron makinoi*; **Б** – в районі центральної жилки *R. makinoi*; **В** – *R. degronianum*, **Г, Г** – *R. callimorphum*; **Д** – *R. brachycarpum*. 1 – adaxial epidermis; 2 – cuticle of adaxial epidermis; 3 – idioblasts in spongy mesophyll; 4 – palisade mesophyll; 5 – abaxial epidermis; 6 – cuticle of abaxial epidermis; 7 – simple trichome; 8 – glandular trichome; 9 – inclusion of calcium oxalate.

нерозгалуженими трихомами з абаксіального боку. У дорослих екземплярів *R. makinoi* опушення листків з абаксіального боку теж значно збільшується і є найгустішим серед розглянутих видів. Такі зміни вказують на подібність цих видів. Інші ж якісні ознаки епідерми листків дорослих особин залишаються подібними до таких у однорічних рослин.

У всіх досліджених видів стовпчаста паренхіма складається з 2–3 шарів витягнутих клітин (Рис. 2 А, В, Г, Д). У *R. makinoi* в області центральної жилки у листків однорічних рослин з'являється один шар гіподерми з потовщеними стінками. Губчаста паренхіма складається з тонкостінних великих клітин та розміщених тяжами більш дрібних ідіобластів з пористими стінками, в області центрального провідного пучка такі ідіобласти містять більше включень (Рис. 2 Б).

Слід відмітити, що Nilsen & Scheckler (2003) виявили особливі гігантські ідіобласти присутні здебільшого у адаксіальній частині листової пластинки у представників секції *Vireya* (Blume) H.F. Copel. Однак звичні ідіобласти широко поширені серед решти представників роду. Зокрема, за нашими даними, всі досліджені види секції *Ponticum* мають дрібні ідіобласти, які розміщені групами-тяжами в губчастій паренхімі. Дослідження Nilsen & Scheckler (2003) спростували функціональну роль ідіобластів в регулюванні проникнення світла та механізмів скручування листка для представників секції *Vireya*, оскільки ідіобласти в цих видів розміщені переважно з адаксіальної сторони листка, тоді як листок закручується донизу (Nilsen 1991, 1992). Така фізіологічна особливість листків позитивно корелює з холодостійкістю цих рослин (Nilsen & Tolbert 1993). Також, ідіобластам деяких рододендронів властива секреторна функція (Nilsen & Scheckler 2003). Ми схилиємося до думки Orcutt & Nilsen (2000), згідно якої основною роллю ідіобластів все ж таки є запасання полімеризованих сполук з метою формування оборонного механізму від травоядних тварин. Наявність ідіобластів

саме на абаксіальному боці листків (хоча і не в епідермі) у рослин секції *Ponticum* не дозволяє повністю відкидати можливість значення ідіобластів у скручуванні цих листків.

У *R. makinoi* та *R. callimorphum* в губчастій паренхімі присутні друзи оксалату кальцію у більшій кількості, порівняно з іншими двома видами (Рис. 2 Б, Г). Кристали в друзах розміщені переважно радіально. З літературних джерел відомо, що накопичення кристалів кальцію є адаптивною відповіддю на втрату води шляхом регулювання внутрішньоклітинного рН (Ayala-Cordero *et al.* 2006). Також накопичення оксалату кальцію в тканині поруч з продирами та в ксилемі сприяє закриттю продихів протягом дня і, відповідно, зниженню транспірації (Ruiz & Mansfield 1994; Monje & Baran 2002). Більша кількість оксалатів, на нашу думку, є задатком більш вищої посухостійкості для *R. makinoi* та *R. callimorphum*.

Для кращого розуміння здатності рододендронів адаптуватися до різних кліматичних умов додатково було проведено ряд морфометричних вимірювань (Табл. 1). Як видно, за багатьма морфометричними ознаками представники *R. degronianum* та *R. makinoi* (природний ареал обидвох видів – острів Хонсю в Японії) достовірно не відрізняються між собою, тоді як *R. callimorphum* та *R. brachycarpum* відрізняються за більшістю досліджених ознак. Разом з цим, однорічні листки *R. degronianum* мають товщу листову пластинку за рахунок потовщення губчастої паренхіми та значно більшу площу адаксіальних епідермоцитів порівняно з листками *R. makinoi*. Тоді як останні вужчі та значно щільніше вкриті трихомами.

Найбільша кількість продихів поряд з великими їх розмірами спостерігається у *R. degronianum*, що вказує на кращу транспірацію, а отже охолодження листової пластинки, тоді як у *R. callimorphum* продихів найменше, а у *R. brachycarpum* їх розміри найменші водночас з малою кількістю. Такі показники поряд з

Табл. 1. Морфометричні параметри листка деяких видів роду *Rhododendron* ($M \pm m$).Table 1. Morphometric parameters of leaf of some *Rhododendron* species ($M \pm m$).

Параметр	<i>R. brachycarpum</i>	<i>R. callimorphum</i>	<i>R. degonianum</i>	<i>R. makinoi</i>
Довжина продохів, мкм	23,6 $\pm$ 1,7 ^{*,^}	26,5 $\pm$ 2	25,4 $\pm$ 2	25,9 $\pm$ 2,3
Ширина продохів, мкм	20,6 $\pm$ 1,8 ^{*,^}	26,7 $\pm$ 2 [^]	21,7 $\pm$ 1,9	21,9 $\pm$ 1,9
Кількість продохів шт./мм ²	44,9 $\pm$ 9,3 [#]	23,5 $\pm$ 5,9 ^{*,^}	53,7 $\pm$ 6,2	49,3 $\pm$ 7,7
Площа адакс. епідермоцитів, мкм ²	1142 $\pm$ 275 ^{*,^}	1375 $\pm$ 220 ^{*,^}	971 $\pm$ 181 [*]	598 $\pm$ 109
Площа абакс. епідермоцитів, мкм ²	727 $\pm$ 182 ^{*,^}	619 $\pm$ 136	649 $\pm$ 248	534 $\pm$ 211
Товщина адакс. епідерми, мкм	82 $\pm$ 12,6	86 $\pm$ 16,1	85 $\pm$ 14,2	81 $\pm$ 12,1
Товщина зовнішньої клітинної стінки адакс. епідерми, мкм	27 $\pm$ 6,3 ^{*,^}	36 $\pm$ 12,5 ^{*,^}	46 $\pm$ 8,7	44 $\pm$ 6,9
Товщина стовпчастої паренхіми, мкм	555 $\pm$ 99	577 $\pm$ 123,3 [*]	525 $\pm$ 82	480 $\pm$ 107
Товщина губчастої паренхіми, мкм	713 $\pm$ 154 [^]	703 $\pm$ 112 [^]	848 $\pm$ 165 [*]	725 $\pm$ 87
Товщина абакс. епідерми, мкм	80 $\pm$ 12,2 ^{*,^}	75 $\pm$ 12,2 ^{*,^}	64 $\pm$ 8,5	59 $\pm$ 9,1
Товщина зовнішньої клітинної стінки абакс. епідерми, мкм	25 $\pm$ 5,4 ^{*,^}	21 $\pm$ 4,8	21 $\pm$ 7,8	18 $\pm$ 4,2
Товщина листка, мкм	1453 $\pm$ 159 [^]	1508 $\pm$ 152 [*]	1573 $\pm$ 158 [*]	1345 $\pm$ 141

* – $P < 0,05$ порівняно з *R. makinoi*; ^ – порівняно з *R. degonianum*; # – порівняно з *R. callimorphum*.

* – $P < 0,05$ in comparison with *R. makinoi*; ^ – in comparison with *R. degonianum*; # – in comparison with *R. callimorphum*.

відносно тонкою зовнішньою клітинною стінкою епідерми та кутикулою, ймовірно зумовлюють більше перегрівання листкової пластинки в останніх двох видів, тобто обумовлюють їх низьку спекостійкість. Разом з цим, велика кількість вклячень оксалата кальцію та мала кількість продохів у *R. callimorphum* є ознаками посухостійкості даного виду. Порівняно тонка абаксiальна епідерма у *R. makinoi* компенсується дуже густим опушенням довгими трихомами, що також значно зменшує негативний вплив температури чи підвищеної інсоляції. Ознаками більшої ксерофітності *R. degonianum* та *R. makinoi* є дрібніші епідермальні клітини, особливо з адаксiальної сторони, та найтонша листкова пластинка у *R. makinoi*.

Nilsen & Tolbert (1993) показали, що *R. brachycarpum* (природний ареал Далекий Схід Росії, Курили, Приморський край) найбільш морозостійкий вид, що витримує морози до -27°C . *R. makinoi* та *R. degonianum* децю менш морозостійкі і витримують морози до -24°C . Можливо посилену морозостійкість у *R. brachycarpum* зумовлює потовщення абаксiальної епідерми поряд з малими розмірами продохів, що в свою чергу знижує інтенсивність дихання та, відповідно, транспірації, а отже, висихання при низьких температурах.

Висновки

Таким чином, найбільше виражені ксерофітні ознаки виявлені у представників *R. makinoi*.

За багатьма морфометричними ознаками види, природним ареалом яких є остров Хонсю (*R. degronianum* та *R. makinoi*), достовірно не відрізняються між собою, що може свідчити про спрямовані в одному напрямку адаптивні механізми даних рослин, хоча вони й зростають на різній висоті над рівнем моря. Існування достовірної відмінності серед таких показників, як товщина листкової пластинки, товщина губчатої паренхіми, площа адаксіальних епідермоцитів та кількість трихом з абаксіального боку може бути додатковим таксономічним критерієм для розмежування *R. makinoi* та *R. degronianum*, хоча, ймовірно, не є достатньою підставою для виділення *R. makinoi* як самостійного виду. Для з'ясування цього питання необхідні додаткові дослідження.

Найбільш суттєво досліджені види відрізняються за типом та кількістю трихом. Характерною ознакою *R. callimorphum* є багатоклітинні залозисті трихоми.

Виявлено, що досліджені види секції *Ponticum* мають ідіобласти в губчатій паренхімі листків.

Використані джерела

- Ayala-Cordero G., Terrazas T., Lopez-Mata L., Trejo C. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *J. Exp. Bot.* **57**: 3165–3174.
- Baranova M.A. 1985. Classification of morphological types of stomata. *Bot. J. (USSR)* **70** (12): 1585–1595. (In Russian)
- Bondar Yu.V. 2012. The comparative analysis of leaf anatomical structure of *Rhododendron catawbiense* Michx. and *Rh. maximum* L. applied in green building of Bugsko-Palesky region. *Mod. Phytomorphol.* **2**: 67–69. <https://doi.org/10.5281/zenodo.162441> (In Russian)
- Bondar Yu.V., Zerkal S.V. 2013. Comparative analysis of the leaf epidermis of two *Rhododendron* species in the conditions of Bugsko-Palesky region. *Mod. Phytomorphol.* **4**: 213–215. <https://doi.org/10.5281/zenodo.161374> (In Russian)
- Chamberlain D., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K.S. 1996. The genus *Rhododendron*. Its classification and synonymy. Royal Botanical Garden, Edinburgh, U.K.
- Cullen J., Knees S.G., Cubey H.S. (eds) 2011. The European garden flora. Vol. IV. Cambridge University Press, Cambridge.
- Goetsch L., Eckert A.J., Hall B.D. 2005. The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): A phylogeny based upon *RPB2* gene sequences. *Syst. Bot.* **30** (3): 616–626.
- Hyam R. 2010. Molecular and conventional data sets and the systematics of *Rhododendron* L. subgenus *Hymenanthus* (Blume) K. Koch. http://www.hyam.net/publications/Hyam_Rhododendron_Thesis_2010_Edition.pdf
- Krüssmann G. 1978. Handbuch der Laubgehölze. Paul Parey, Berlin.
- Monje P.V., Baran E.J. 2002. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiol.* **128**: 707–713.
- Nilsen E.T. 1991. The relationship between freezing tolerance and thermotropic leaf movement in five *Rhododendron* species. *Oecologia* **87**: 63–71.
- Nilsen E.T. 1992. Thermonastic leaf movements: A synthesis of research with *Rhododendron*. *Bot. J. Linn. Soc.* **110**: 205–233.
- Nilsen E.T., Scheckler S.E. 2003. A unique “giant cell” type in leaves of *Vireyas*. *J. Am. Rhododendron Soc.* **57** (1). <http://scholar.lib.vt.edu/ejournals/JARS/v57n1/v57n1-nilsen.htm>
- Nilsen E.T., Tolbert A. 1993. Does winter leaf curling confer cold stress tolerance in *Rhododendron*? *J. Am. Rhododendron Soc.* **47** (2). <http://scholar.lib.vt.edu/ejournals/JARS/v47n2/v47n2-nilsen.htm>
- Orcutt D.M., Nilsen E.T. 2000. The physiology of plants under stress: Soil and biotic factors. John Wiley Incorporated, New York.
- Romeys B. 1954. Microscopic technique. Publ. of Abroad Literature, Moscow. (In Russian)
- Ruiz L.P., Mansfield T.A. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* **127**: 473–476.
- Walter K.S., Gillett H.J. (eds) 1998. 1997 IUCN red list of threatened plants. IUCN – The world conservation union.
- Zakharevich S.F. 1954. Toward the methodology of leaf description. *Proc. Leningrad Univ.* **4**: 65–75. (In Russian)
- Zarubenko A.U. 2006. Culture of rhododendrons in Ukraine. VPC Kyiv University, Kyiv. (In Ukrainian)