

SHORT COMMUNICATION

CORRELATION BETWEEN STEVIOSIDE CONTENT IN LEAVES, THEIR SURFACE AND THE NUMBER OF ROOTS IN PLANT

Tran Thi Truong¹, P. Valíček¹, A. Nepovím², T. Vaněk²

¹ Czech University of Agriculture, Faculty of Agronomy, Prague, Czech Republic

² Institute of Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Correlation between stevioside content, leaf surface and number of roots was determined in 40 plants of *Stevia rebaudiana* species in 4 variants. Correlation coefficients within the frame of this experiment reached the values of $r = 0.57$ to $r = 0.97$ and they prove that the stevioside content is influenced by both indicators observed. However the leaf surface has greater influence on stevioside content than the number of roots.

Stevia rebaudiana; correlations; leaf surface; number of roots; stevioside content

INTRODUCTION

Stevia rebaudiana Bertoni is a small semitropical to tropical perennial herb of the family *Asteraceae*. Dry leaves of this plant contain 3 to 11% of stevioside which has 300 times higher sugar content than saccharose and may be used as low-energy sweetener with antidiabetes effects. In recent years high economic value of *Stevia* has been showed. Therefore it may be more and more significant and interesting in the sense of commercial utilization in many countries.

MATERIAL AND METHODS

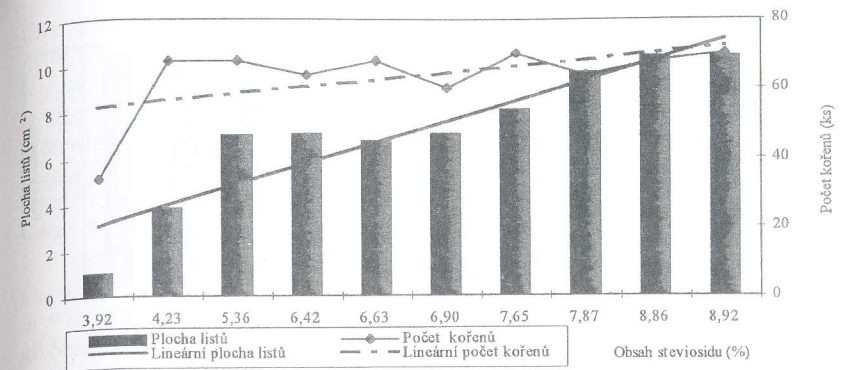
The trials were conducted in the year 1997 in greenhouses and in the plot of the Czech University of Agriculture in Prague-Suchbát and at the Institute of Chemistry and Biochemistry of Academy of Sciences in Prague-Dejvice. Four *Stevia* clones were chosen for the trial (1, 2, 3, 4), each with ten plants. Seed plants were planted on 19 May 1997. Leaf surface was finding by weighing method (Rybářek et al., 1970). The stevioside content was analyzed by means of reversed-phase high-performance chromatography (RP-HPLC). HPLC pump (type 501; Waters, U.S.A.), dosing device (type 7125; Rheodyne, U.S.A.), gradient of mobile phase water-acetonitril (5–55%) for 20 minutes were used in analysis. Analysis was carried out in the metallic column of the size 250 x 4 mm i.d. filled in the reversed phase Si - C₁₈, 7 μm/Biospher) at the pressure 1,500 p.s.i. and flow rate in the mobile phase (1.5 ml/min) (Nepovím et al., 1996). Analyses were performed at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences in Prague. The results obtained were processed by the method of regression analysis in the program STATGRAPHICS, version 4.0, 1989, by determination of the correlation coefficient (*r*). The correlation between three parameters was proved, these are: X₁ (number of roots – pieces), X₂ (leaf surface – cm²) and Y (stevioside content – %) in equation $Y = b_0 + B_1X_1 + b_1X_2$. Then the values of correlation between these traits in equation $Y = a + bX$ were determined.

RESULTS

The stevioside content, leaf surface and the number of roots are plotted by linear dependence in the models $Y = 3.48 - 0.12X_1 + 0.68X_2$ with highly significant dependence ($r = 0.97$) in the first variant; $Y = -1.83 + 0.1X_1 + 0.3X_2$ ($r = 0.59$) in the second variant; $Y = -0.73 + 0.20X_1 + 0.72X_2$ ($r = 0.93$) in the third variant and $Y = 0.07 - 0.01X_1 + 0.70X_2$ ($r = 0.82$) in the fourth variant.

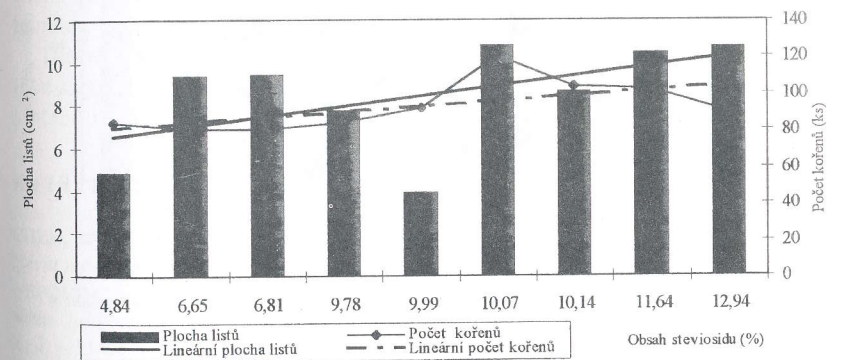
The stevioside content and leaf surface in different variants are plotted by linear dependences in the models $Y = 2.16 + 0.89X$, $Y = 7.83 + 2.9X$ and $Y = 5 + 0.46X$, stevioside content and the number of roots are plotted by linear dependence in the models $Y = 52.93 + 1.9X$, $Y = 5.0 + 0.49X$, $Y = 54.5 + 2.36X$ and $Y = 35.13 + 4.59X$ (Figs. 1, 2, 3 and 4).

Results presented in Table I show that correlation coefficient between leaf surface and the stevioside content reached the values $r = 0.59$ – 0.95 , between the number of roots and stevioside content $r = 0.42$ – 0.53 and between the number of roots and leaf surface $r = 0.53$ – 0.78 .



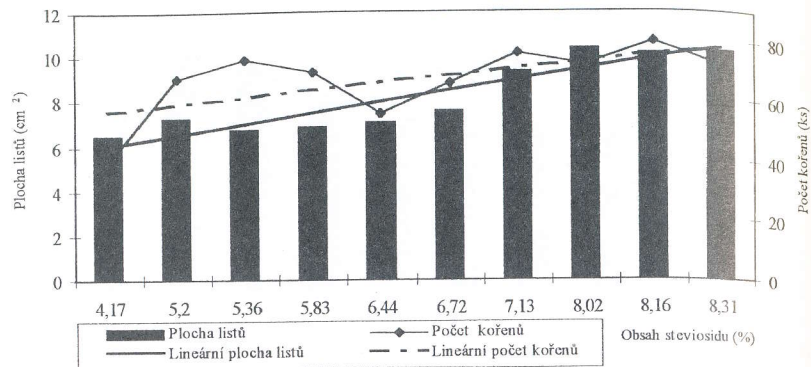
1. Relationship between stevioside content, leaf surface and number of leaves – variant 1
 $Y = 2.16 + 0.89X$ leaf surface, $Y = 52.93 + 1.9X$ number of roots

For Figs 1–4: plocha listů = leaf surface, počet kořenů = number of roots (pieces), lineární plocha listů = linear leaf surface, lineární počet kořenů = linear number of roots, obsah steviosidu = stevioside content

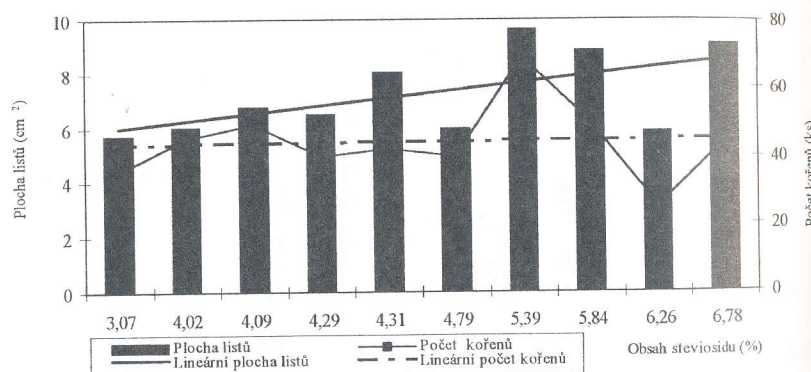


2. Relationship between stevioside content, leaf surface and number of leaves – variant 2
 $Y = 7.83 + 2.9X$ leaf surface, $Y = 5.0 + 4.9X$ number of roots

It is evident from all this that leaf surface affects the stevioside content more than the number of roots. At the same time the leaf surface and the number of roots are also mutually affected.



3. Relationship between stevioside content, leaf surface and number of leaves – variant 3
 $Y = 5.5 + 0.48X$ leaf surface, $Y = 54.5 + 2.36X$ number of roots



4. Relationship between stevioside content, leaf surface and number of leaves – variant 4
 $Y = 5.0 + 0.46X$ leaf surface, $Y = 35.13 + 1.59X$ number of roots

DISCUSSION

In the population of seed plants the content of stevioside in leaves is higher than in the plants with greater leaves and higher number of roots. It can be explained by the fact that gibberellin supports the production of stevioside, because Striedner et al. (1991) found that by adding of gibberellin GA₃ to cellular suspension appears a fast conversion to stevioside. Chen and Li (1993) came to the same results when they described in their work the trial

I. Correlation values (r) between traits

Trait	Clone 1		Clone 2		Clone 3		Clone 4	
	stevioside	roots	stevioside	roots	stevioside	roots	stevioside	roots
Stevioside	–	0.53	–	0.48	–	0.62	–	0.42
Leaf surface	0.92	0.53	0.59	0.61	0.91	0.61	0.95	0.78

Clone – a progeny vegetatively propagated (selected) plants

in which they cultivated the callus on the solid medium with addition of gibberellin GA₃. They found that the stevioside content in the callus depends on the concentration of added gibberellin into the medium. Švihra et al. (1981) confirmed that gibberellin arises from mevalonic acid through several terpenoid intermediates (kaurane, steviol), which is synthesised on the plant above all in roots. Ogawa et al. (1980) found that steviol was transformed to stevioside during the process of stevioside synthesis.

It means that where are more roots, or larger leaves, stevioside production in plant increases. Correlation coefficient between stevioside content, number of roots and leaf surface reached various values in dependence on each variant. This investigated trait has a meaning for the aim of *Stevia* breeding to increase the stevioside content.

The results of this trial show that the stevioside content affects both the investigated traits, however more leaf surface than the number of roots. Leaf surface is in mutual positive correlation with the number of roots.

References

- CHEN, S. Y – LI, Q. R.: Influence of growth regulatory substances on stevioside content of *Stevia rebaudiana* callus. *Zhiwu Shenglixue Tongxun*, 29, 1993: 265–267.
- NEPOVÍM, A. et al.: Comparison of stevioside production in the intact and tumour transformed *stevia*. In: Proc. of Czech-Taiwan R.O.C. Symp. on Biotechnology (ed. BARTH, T. – WANG, K. T. – LIAO, I. CH. – VANĚK, T. – CHEN S. T.), Prague, Czech Republic, June 5–8, 1995: 149–152.
- OGAWA, T. et al.: Total synthesis of stevioside. *Phytochemistry*, 36, 1980: 2641–2648.
- RYBÁČEK, V. et al.: Rostlinná výroba 3 (Plant production 3). Praha, Státní zemědělské nakladatelství 1970.
- STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION: Statgraphics, version 4.0, USA, 1989.
- STRIEDNER, J. et al.: Accumulation of secondary metabolites by means of a precursor and by elicitation of cell cultures. *Acta Biotechnol.*, 11, 1991: 505–509.
- ŠVIHRA, J. et al.: *Fyziologie rostlin (Physiology of plants)*. Bratislava, Příroda 1981.

Received for publication on March 17, 1999

TRUONG, TRAN THI – VALÍČEK, P. – NEPOVÍM, A. – VANĚK, T. (Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Praha; Ústav chemie a biochemie AV ČR, Praha, Česká republika):

Korelace mezi obsahem steviosidu v listech, jejich plochou a počtem kořenů na rostlině.

Scientia Agric. Bohem., 30, 1999: 249–255.

Stevia rebaudiana Bertoni je nevelká polotropická až tropická víceletá bylina patřící do čeledi *Asteraceae*, hvězdicovitých. Suché listy této rostliny obsahují 3 až 11 % steviosidu, který má až 300krát vyšší sladivost než sacharóza a může být použit jako nízkoenergetické sladidlo s antidiabetickými účinky. V nedávných letech se ukázala vysoká ekonomická hodnota stvie. Proto může být stále významnější a zajímala větší ve smyslu komerčního využití v mnoha zemích. Cílem experimentu bylo ověření korelací mezi obsahem steviosidu v listech, jejich plochou a počtem kořenů. V případě kladné korelace bychom získali vysoký výnos listů s vyšším obsahem steviosidu.

Pokusy probíhaly v letech 1997 ve sklenících i na pozemku v areálu České zemědělské univerzity v Praze-Suchdole a v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR v Praze-Dejvicích. Pro pokus byly vybrány čtyři klony stvie (1, 2, 3, 4), u každého po 10 rostlinách. Semenáčky byly vysazeny 19. 5. 1997. Plocha listu se zjišťovala vážkovou metodou (Rybáček et al., 1970). Obsah steviosidu byl analyzován pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Při analýze bylo použito HPLC pumpy (typ 501; Waters, USA) dávkovače (typ 7125; Rheodyne, USA), gradientu mobilní fáze voda – acetonitril (5 % – 55 %) po dobu 20 minut. Analýza probíhala v kovové koloně o rozměrech 250 x 4mm i.d. plněné reverzní fázi Si – C₁₈, 7 μm/Biospher) při tlaku 1 500 p.s.i. a průtoku mobilní fáze 1.5 ml/min (Nepovím et al., 1996). Rozbory byly provedeny v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze. Získané výsledky byly zpracovány metodou regresní analýzy v programu STATGRAPHICS, verze 4.0, 1989. Stanovením koeficientu korelace (r) byla prokazována korelace mezi třemi parametry, a to X_1 (počet kořenů – ks), X_2 (plocha listu – cm²) a Y (obsah steviosidu – %) v rovnici $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$. Dále byly stanoveny hodnoty korelací mezi těmito znaky v rovnici $Y = a + bX$.

Obsah steviosidu, plocha listu a počet kořenů jsou vyneseny lineární závislostí v modelech $Y = 3,48 - 0,12X_1 + 0,68X_2$ s vysoce průkaznou závislostí ($r = 0,97$) u první varianty; $Y = -1,83 + 0,1X_1 + 0,3X_2$ ($r = 0,59$) u druhé varianty; $Y = -0,73 + 0,20X_1 + 0,72X_2$ ($r = 0,93$) u třetí varianty a $Y = 0,07 - 0,01X_1 + 0,70X_2$ ($r = 0,82$) u čtvrté varianty.

Obsah steviosidu a plocha listů u jednotlivých variant jsou vyneseny lineární závislostí v modelech $Y = 2,16 + 0,89X$, $Y = 7,83 + 2,9X$, $Y = 5,5 + 0,48X$ a $Y = 5 + 0,46X$, obsah steviosidu a počet kořenů jsou vyneseny lineární závislostí v modelech $Y = 52,93 + 1,9X$, $Y = 5,0 + 0,49X$, $Y = 54,5 + 2,36X$, $Y = 35,13 + 4,59X$ (obr. 1 až 4).

Výsledky uvedené v tab. I ukazují, že koeficienty korelace mezi plochou listů a obsahem steviosidu dosahovaly hodnoty $r = 0,59–0,95$, mezi počtem kořenů a obsahem steviosidu $r = 0,42–0,53$ a mezi počtem kořenů a plochou listů $r = 0,53–0,78$.

Z tohoto je patrné, že plocha listu ovlivňuje obsah steviosidu více než počet kořenů. Zároveň se také plocha listu a počet kořenů vzájemně ovlivňují.

V populaci semenáčků byl vyšší obsah steviosidu v listech převážně u rostlin s většími listy a vyšším počtem kořenů, což je možné zdůvodnit tím, že giberelin podporuje tvorbu steviosidu. Strieder et al. (1991) zjistili, že přidáním giberelinu GA₃ k buněčné suspenzi dochází k rychlé přeměně na steviosid. Ke stejným výsledkům dospěli i Chen a Li (1993), kteří popsali pokus, ve kterém pěstovali kalus na pevném médiu s přidavkem giberelinu GA₃. Zjistili, že obsah steviosidu v kalusu závisí na koncentraci giberelinu přidaného do média. Švihra et al. (1981) potvrdili, že giberelin vzniká z kyseliny mevalonové přes některé terpenoidní meziprodukty (kauren, steviol) a na rostlině se syntetizuje především v kořenech. Ogawa et al. (1980) zjistili, že steviol se transformuje na steviosid při procesu syntézy steviosidu.

Znamená to, že když má rostlina více kořenů, případně větší listy, zvyšuje se v ní tvorba steviosidu. Koeficient korelace mezi obsahem steviosidu, počtem kořenů a plochou listu dosahoval různých hodnot, a to v závislosti na každé variantě.

Výsledky tohoto pokusu dokazují, že obsah steviosidu ovlivňují oba sledované znaky, avšak plocha listů více než počet kořenů. Plocha listů je ve vzájemně kladné korelaci s počtem kořenů.

Stevia rebaudiana; korelace; plocha listů; počet kořenů; obsah steviosidu

Contact Address:

Ing. Pavel Valíček, Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchdol, Česká republika