

УДК 573.6:581.143.6:635

## ПОЛІПЛОЇДИЗАЦІЯ СТЕВІЇ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

**В. Й. СТЕФАНЮК**, кандидат сільськогосподарських наук

*Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків*

*Національної академії аграрних наук України*

*E-mail: isb@isb.kiev.ua*

**Анотація.** На підставі проведених досліджень *in vitro* розроблена методика створення тетраплоїдов стевії. Для їх створення в культурі *in vitro* використовували диплоїдні селекційні номери стевії 1216, 15-15/3, 112, 116, які стійкі до хвороб і мають високий вміст стевіозиду; культивування проводили в умовах температури  $24 \pm 2$  °C, освітлення 3000-4000 лк, фотоперіоду – 16 годин, на шейкері в режимі 100 об./мін. Для клонального мікророзмноження пагони, оброблені 0,02 % колхіцином, окремо пересаджують в середовищі агар-агару. Через 5 діб культивування новоутворені пагони відокремлюються, реєструються з визначенням вегетативного покоління колхіцинованого втечі. Друге вегетативне покоління пагонів, в кількості не менше 3 штук, після двох тижнів культивування використовували для визначення плоїдності і відбору тетраплоїдов. Для синхронізації ділення клітин меристеми колби ставили в холодильник на 12 годин при температурі +4 °C, а потім на 2,5-3 години на світло для отримання 3000-4000 лк. В таких умовах отримують до 37% плоїдності тетраплоїдних форм стевії з високою продуктивністю і стійких до грибкових захворювань.

**Ключові слова:** поліплоїдизація, колхіцин, стевія, культура *in vitro*, тетраплоїди

**Актуальність.** Упродовж тисячоліть індіанці племені гуарані на території сучасної Бразилії та Парагваю використовували в їжу деякі види стевії, в особливості *Stevia rebaudiana*, яку вони називали *ka'ahe'e* («солодка трава») в якості підсолоджувача до мате і інших медичних чаїв, для лікування різноманітних хвороб [1].

За деякими припущеннями, свою назву стевія отримала завдяки російському ботаніку шведського походження Х. Х. Стевену (1781-1863) [4]. Вперше вона була досліджена іспанським лікарем і ботаніком Стевусом (лат. *Petrus Jacobus Stevus*/ ісп. *Pedro Jaime Esteve*), за прізвищем якого отримала латинську назву. В подальшому розпочалась праця з виготовлення екстракту,

який став досліджувати Мойзес Сант'яго Бертоні, директор агрономічного коледжу в столиці Парагваю разом із хіміком Овідія Ребауді [2]. Після багатьох років проведення різноманітних досліджень і отримання екстракту, що підтверджували його цінність як для харчової так і медичної галузі, дану рослину зареєстрували під назвою *Stevia rebaudiana (Bertoni)* [2]. Відомо, що в 1931 році французькі хіміки М. Бريدель і Р. Лавьей виділили із стевії глікозиди, що дають їй солодкуватий присмак. Екстракти отримали назву стевіозиди (англ. *steviosides*) і ребаудіозиди (англ. *rebaudiosides*), які виявились солодшими за сахарозу в 250-300 разів [5].

**Глікозиди** (від грец. *γλυκύς* – солодкий та *είδο* – вигляд) – природні органічні речовини, сполуки складної будови, дуже поширені в рослинному світі; з погляду хімії це є продукти конденсації циклічних форм вуглеводів (моно- або олігосахаридів) та компонента неуглеводної природи (аглікону), яким можуть бути стероїди, феноли або алкалоїди. Маючи таким чином половину молекули цукру, вони близькі до вуглеводів, що дає змогу об'єднати їх в одну групу [6].

У 1952 р. була визначена хімічна структура солодкого компонента стевії – стевіозид. Встановлено, що він є дитерпеновим глікозидом, що складається із трьох молекул глюкози і аглюкону – стевіола. Крім стевіозиду, в листі стевії виявили і інші солодкі глікозиди – ребаудіозиди (А, В, С, Д і Е), дуліобіозид і стевіолбіозид із різним ступенем солодкості порівняно із сахарозою (від 50 до 450). Найбільш солодким з них є ребаудіозид А – ступінь солодкості 350-450. У сухому листі стевії міститься близько 3% ребаудіозиду. На відміну від стевіозиду, він краще розчиняється у воді і має менш інтенсивний неприємний післясмак, ніж стевіозид [7].

Порівняно із диплоїдними, тетраплоїдні форми стевії мають більшу вегетативну масу і вміст глікозидів.

**Мета дослідження** – розробити методику створення тетраплоїдів стевії в культурі *in vitro* і встановити оптимальну кількість колхіцину для отримання поліплоїдного ефекту.

**Матеріали та методика досліджень.** У якості вихідних матеріалів для розробки методу створення тетраплоїдів в культурі *in vitro* були використані диплоїдні селекційні номери стевії 1216, 15-15/3, 112, 116, що є стійкими до хвороб і мають високий вміст стевіозиду. В подальшому проводили їх клональне мікро розмноження. Пагони стевії в кількості 40-50 штук поміщали в колби ємністю 250 мл, в яких було 30 мл модифікованого живильного середовища за прописом Гамборга і Евелега, доповнене колхіцином в концентрації 0,01-0,1 %. Культивування проводили за температури  $24 \pm 2$  °C, освітлення 3000-4000 лк, фотоперіоду 16 год на шейкері у режимі 100 об./хв. Пагони, оброблені колхіцином, пересаджували кожний окремо на агаризоване середовище для клонального мікророзмноження. Через 5 діб культивування новоутворені пагони відокремлювалися, реєструвалися з визначенням вегетативного покоління колхіцинованого пагона.

Друге вегетативне покоління пагонів, в кількості не менше 3 штук, після двох тижнів культивування використовували для визначення плоїдності і відбору тетраплоїдів. Для синхронізації ділення меристематичних клітин колби ставили в холодильник на 12 год за температури  $+ 4$  °C, а потім на 2,5-3 год на світло для одержання 3000-4000 лк. У стерильних умовах ламінарної камери відокремлювали 3-4 дочірніх пагони для цитологічного аналізу, а інші пересаджували на середовище для розмноження.

Для визначення плоїдності з пагонів відокремлювали точку росту з двома листочками і за кімнатної температури поміщали в 0,03 % розчин ортооксихіноліну на 3 год. Після цього рослинний матеріал 3 рази промивали дистильованою водою і на 6 хв. поміщали у фіксуєчу і мацеруючу суміш (2 частини 96 % етилового спирту і 1 частина концентрованої соляної кислоти). Потім промивали 3 рази по 5 хв дистильованою водою. На предметному склі виділяли точку росту, фарбували її 3 % розчином ацетоорсеїна і готували тимчасовий препарат. Після підрахунку кількості хромосом не менше, ніж у 10 клітинах на стадії метафази визначали рівень плоїдності. Залишали для

клонального мікророзмноження тільки ті пагони, в яких друге вегетативне покоління виявилось тетраплоїдним.

Контрольну перевірку рівня плоїдності проводили перед укоріненням пагонів і висаджували на живильне середовище ті, які стабільно зберігали тетраплоїдний рівень. Після того, як рослини стевії укорінились і були проведені усі обліки, їх висаджували в поле для вивчення селекційних ознак.

**Результати досліджень та обговорення.** Необхідність одержання поліплоїдних форм стевії пов'язана з їх значно більшою вегетативною масою порівняно з диплоїдами, що відповідно призводить до отримання більшої кількості стевіозиду.

Для одержання поліплоїдів стевії в культурі *in vitro* використовували різні концентрації колхіцину, який додавали в поживне середовище за прописом Гамборга і Евелега.

В залежності від концентрації колхіцину в живильному середовищі та певної експозиції вивчали вихід поліплоїдних форм (табл. 1).

**1. Коливання плоїдності стевії в залежності від концентрації колхіцину, експозиція 5 діб.**

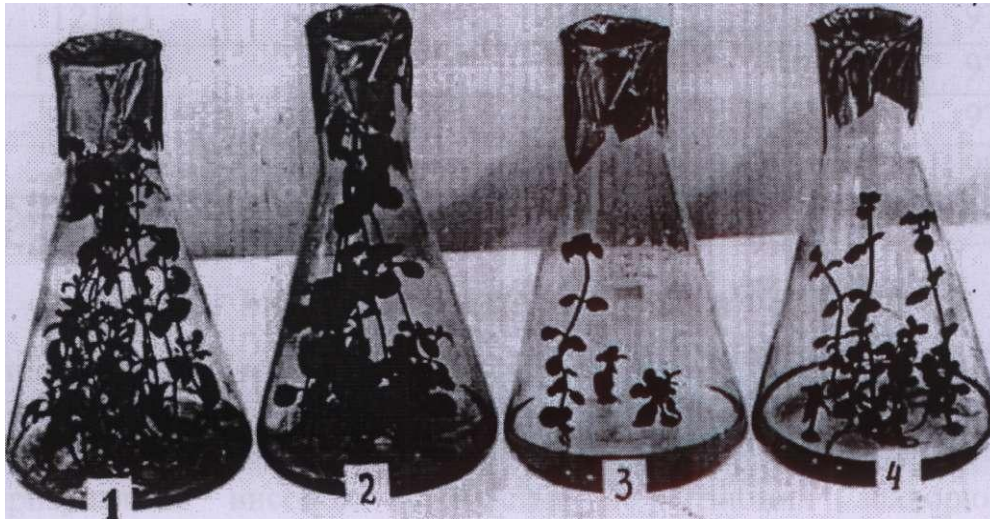
Концентрація колхіцину, %	Плоїдність, %		
	Диплоїди	Тетраплоїди	Міксоплоїди
0 (контроль)	100	-	-
0,01	63	-	37
0,02	51	37	12
0,05	41	26	33
Од	28	21	51

Встановлено, що у стевії виявився найвищий відсоток тетраплоїдів за концентрації колхіцину 0,02 %. Зниження концентрації його до 0,01 % не викликало утворення тетраплоїдів. Проаналізовані пагони без колхіцину залишились на диплоїдному рівні: в них не відбувся процес поліплоїдизації і вони слугували за контрольний варіант.

Утворення найбільшої кількості міксоплоїдів – 51 %.

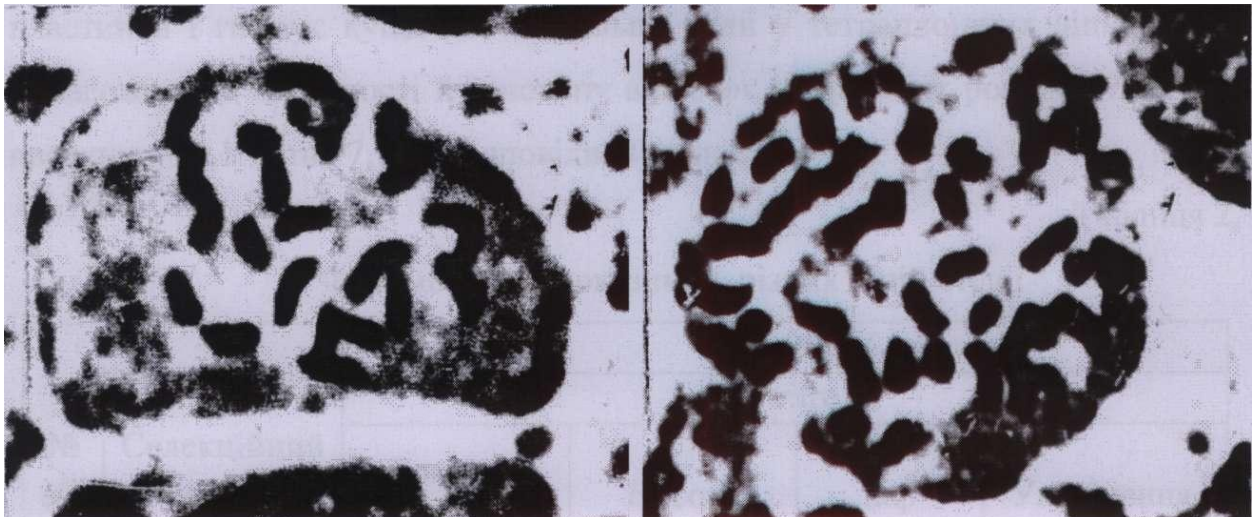
Після проведення цитологічних досліджень в культурі *in vitro* були виділені форми стевії, які містили різний набір хромосом як з диплоїдним, так і тетраплоїдним ( $2n = 44$ ) й гексаплоїдним набором  $2n = 66$  (рис. 1, 2).

Слід також відмітити, що тетраплоїдні рослини стевії в культурі *in vitro* відрізнялись від диплоїдних значно ширшими листовими пластинками. Усі форми стевії також відрізнялись між собою за розмірами та формою листків (фото 3).



**Рис. 1. Клітина стевії з диплоїдним набором хромосом**

**Рис. 2. Клітина стевії з тетраплоїдним набором хромосом**



**Рис. 3. Диплоїдні (1), тетраплоїдні (2) та гексаплоїдні (3, 4) рослини стевії в культурі.**

Диплоїдні форми стевії мали довжину кореневої системи 3,2 см, а тетраплоїдні – 4,4 см. За висотою і кількістю пар листків диплоїдні форми

перевищують тетраплоїдні, але площа листової пластинки і габітус куща значно більші були у тетраплоїдних ліній стевії. Незалежно від плоїдності і генотипу відсоток укорінених рослин стевії був високим – відповідно 98,1 % і 97,7 % (табл. 2).

## 2. Фотометричні показники різних ліній стевії

№ з/п	Селекційний номер	Показники			
		<i>in vitro</i>			
		Довжина кореневої системи, см	Висота рослин, см	Кількість пар листків, шт.	Укорінення, %
2x					
1.	1216	3,0	9,5	7,0	98,0
2.	15-15/3	3,5	10,0	8,0	98,3
3.	112	2,6	9,3	8,0	98,1
4.	116	3,7	12,0	10,0	98,0
Середнє		3,2	10,2	8,3	98,1
4x					
1.	1216-1	4,0	8,2	5,0	97,5
2.	15-15/3-1	4,5	9,2	7,0	97,8
3.	112-1	4,2	8,5	6,0	97,4
4.	116-1	4,8	9,7	7,0	98,0
Середнє		4,4	8,9	6,3	97,7

В результаті вивчення різних матеріалів стевії були виділені високопродуктивні тетраплоїдні номери, які перевищували вихідні диплоїдні форми за показниками продуктивності. Відібрані номери характеризувались високою стійкістю до грибкових захворювань та посухостійкістю.

**Висновок.** Для створення тетраплоїдів в культурі *in vitro* використовували диплоїдні селекційні номери стевії 1216, 15-15/3, 112, 116, що є стійкими до хвороб і мають високий вміст стевіозиду; культивування їх проводили в умовах температури  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , освітлення 3000-4000 лк, фотоперіоду 16 годин на шейкері у режимі 100 об./хв. Пагони, оброблені 0,02 % колхіцином, пересаджують кожний окремо на агаризоване середовище для клонального мікророзмноження. Через 5 діб культивування новоутворені пагони відокремлюються, реєструються з визначенням вегетативного покоління колхіцинованого пагона. Друге вегетативне

покоління пагонів, в кількості не менше 3 штук, після двох тижнів культивування використовували для визначення плоідності і відбору тетраплоїдів. Для синхронізації ділення меристематичних клітин колби ставили в холодильник на 12 год за температури +4 °С, а потім на 2,5-3 год на світло для одержання 3000-4000 лк. В таких умовах отримують до 37 % плоідності тетраплоїдних форм стевії з високою продуктивністю і стійких до грибкових захворювань.

### Список літератури

1. Алексеев В. П. Медовая трава “каа-хэ” / В. П. Алексеев // Бюллетень ВНИИ чая и субтропических культур. – №1. – 1956. – С. 12-14, С. 168-169.
2. Бугаенко И.Ф. Достижения в производстве и применении сахара и подслащающих веществ / И.Ф. Бугаенко // Итоги науки и техники. – 1990. – Т. 3. – 130 с.
3. Бурень В.М. Биология и нанотехнология // Материалы для современной и будущей бионики. Труды Аристотелевской академии формы / В. М. Бурень, О. В. Бурень / Санкт-Петербург, 2004. - 114 с.
4. Kinghorn A.D. Potential sweetening agents of plant origin. I. Purification of *Stevia rebaudiana* constituents by droplet counter current chromatography // Journal of Chromatography / Kinghorn A.D., Nanayakkara N. P., / 1982. - №237. - P. 478 - 483.
5. Mitsuhashi H. Studies on growing *Stevia rebaudiana* Bertoni. Determination of stevioside // Yakugaki zasshi / Mitsuhashi H., Ueno J., Sumida I. 1975. - Vol. 95, N12.- P. 1501-1503.
6. Tanaka O. Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni // Recent Adv. Nat. Prod. Res. 1980.-V. 1,N1.-P. 111-119. Zaidan L.B.P. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni // Jap. J. Crop Sci. / Zaidan L.B.P., Dietrich S.M.C., Fellipe G.M. / 1980. - V. 49, N 4. - P. 569-574.
7. Zaidan L.B.P. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni // Jap. J. Crop Sci. / Zaidan L.B.P., Dietrich S.M.C., Fellipe G.M. / 1980. - V. 49, N 4. - P. 569-574.
8. Чудновский Б.Д. Способы выращивания рассады стевии из материалов, полученных *in vitro* / Б.Д. Чудновский, О.Ю. Запольский // Сб. научных трудов ВНИС. – К., 1990. – С. 9-13

## ПОЛИПЛОИДИЗАЦИЯ СТЕВИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

**В. И. Стефанюк**

*Аннотация.* На основании проведенных исследований в культуре *in vitro* разработана методика создания тетраплоидов стевии, которая позволяет получить высокий выход ценных селекционных форм и сократить срок их получения относительно традиционного способа и делает процесс колхицинирования экономически целесообразным и безвредным.

**Ключевые слова:** полиплоидизация, колхицин, стевия, *in vitro*, тетраплоиды

## STEVIA POLYPLOIDIZATION IN VITRO

V. Y. Stefaniuk

**Abstract.** *On the basis of in vitro studies the methodology of creation of tetraploids stevia. For their creation in vitro culture used diploid selection number of stevia 1216, 15-15/3, 112, 116, which are resistant to diseases and have high stevioside content; the cultivation was conducted under the conditions of temperature  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , lighting 3000-4000 Lux, photoperiod – 16 hours on a shaker in 100 mode.min For clonal micropropagation of shoots, treated with 0.02% colchicine, separately transplanted in the medium of agar-agar. After 5 days' cultivation, newly formed shoots are separated, are registered with the definition of vegetative generations Kohler escape. The second generation of vegetative shoots, in the amount of not less than 3 Grand, after two weeks of culturing were used for the determination of ploidy and selection of tetraploids. To synchronize cell division of meristem flasks were placed in a refrigerator for 12 hours at a temperature of  $+4^{\circ}\text{C}$ , and then 2.5-3 hours on light to obtain 3000-4000 Lux. In such conditions, get up to 37% of ploidy tetraploid forms of stevia with high productivity and resistant to fungal diseases.*

**Keywords:** *polyploidization; colchicines; stevia; in vitro; tetraploids*