

УДК 633.66

Морфологічні та цитологічні ознаки визначення тетраплоїдів стевії медової

Г. В. Цвігун

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України
galina807@ukr.net

Мета. Визначити особливості анатомо-морфологічних ознак рослин стевії для прискорення ідентифікації тетраплоїдних форм. **Методи.** Польовий, лабораторний і метод дисперсійного аналізу. **Результати.** Встановлено, що характерною особливістю анатомо-морфологічних ознак тетраплоїдних форм стевії порівняно з диплоїдними є більший листовий індекс (19–38%), менша кількість продихів на одиниці площі (на 39–48%), більший діаметр пилкових зерен (на 42–92%). **Висновки.** Допоміжними критеріями добору (експрес-метод) є параметри листової пластинки, розміри продихів і діаметр пилку. У тетраплоїдних форм стевії листовий індекс (відношення довжини до ширини листової пластинки), а також розмір продихів і діаметр пилку є достовірно більшими порівняно з диплоїдними формами. Основним і найточнішим критерієм добору тетраплоїдних форм є визначення кількості хромосом на основі цитологічного аналізу, що доцільно використовувати на пізніших етапах добору.

Ключові слова: стевія, поліплоїди, тетраплоїди, гексаплоїди, листовий індекс, хромосоми.

Вступ. Стевію медову (*Stevia rebaudiana* Bertoni) широко використовують в Україні та світі як природний підсолоджувач. Крім того, вона містить білки, мінерали (фосфор, кальцій, залізо, натрій, магній, хром, кобальт, селен, кремній), а також ефірні олії, флавоноїди, таніни й ряд вітамінів, зокрема аскорбінову кислоту (вітамін С), бета-каротин (провітамін А), рибофлавін (вітамін В₂). Глікозиди листків стевії мають такі технологічні характеристики: швидко розчиняються у воді, добре поєднуються з органічними кислотами овочів та фруктів, залишаються під час кип'ятіння, є стійкими до кислих і лужних середовищ [1–3].

Створення тетраплоїдних форм стевії дасть можливість збільшити вихід рослинної біомаси за рахунок підвищення продуктивності. Поліплоїдні рослини характеризуються комплексом анатомо-морфологічних ознак, фізіологічних і біохімічних властивостей, які зумовлені їхнім генотипом. Тетраплоїди відрізняються від диплоїдів за вегетативною масою, висотою рослин, кількістю стебел, зменшеною довжиною міжвузлів [4], величиною й товщиною листків, формою листової пластинки, запізнитим цвітінням. Ці ознаки й властивості дають змогу досить легко розпізнати їх серед вихідних диплоїдних форм.

Поліплоїди ідентифікують також за розмірами клітини, збільшення яких безпосередньо пов'язане з подвоєнням кількості хромосом. Для цього найчастіше використовують клітини продихового апарату (форма, розміри та характер контуру клітин нижньої епідерми) та пилкові зерна. У процесі переходу рослин на більший рівень плоїд-

ності розміри продихів і пилкових зерен збільшуються на 20–35% [5, 6].

З літературних джерел відомо, що розміри продихів залежать від рівня геному – чим вища плоїдність, тим більшим є розмір продихового апарату та меншою кількістю продихів на одиницю площі [7, 8]. Тому цей критерій може бути допоміжним для прискорення ідентифікації тетраплоїдних рослин стевії.

Метою досліджень є визначення особливостей анатомо-морфологічних ознак рослин стевії для прискорення ідентифікації тетраплоїдних форм. Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

- встановити відмінність між листовими пластинками рослин стевії різної плоїдності;
- дослідити параметри продихового апарату та пилкових зерен поліплоїдних форм;
- визначити доцільність проведення добору за морфологічними та цитологічними ознаками.

Матеріали та методика досліджень. Дослідження проводили протягом 2006–2010 рр. у лабораторії стевії та на дослідному полі Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН.

Вихідним матеріалом були диплоїдні селекційні номери стевії 1 м і ЗН (контроль), які обробляли колхіцином для поліплоїдизації. Мікроклональне розмноження рослин стевії проводили за методикою І. І. Ільєнка [9].

Для досліджень параметрів морфологічних ознак з кожного варіанта відбирали по 30 рослин, на 10 листках одного віку визначали параметри листових пластинок та вивчали продиховий апарат за допомогою мацераційного методу з використанням суміші

Щульце (концентрація HNO_3 з додаванням кристалів KClO_3). Для цього вирізали шматочки епідерми із середньої частини листової пластинки. Під мікроскопом розглядали верхню та нижню епідерму, визначали тип продихового апарату та кількість клітин епідерми [10]. Встановлювали кількість продихів у полі зору мікроскопа в перерахунок на 1 мм^2 , вимірювали довжину й ширину продихів у 20-разовій повторюваності.

Діаметр пилкових зерен вимірювали за допомогою лінійного окуляр-мікрометра. Рівень плоідності встановлювали методом підрахунку кількості хромосом у точках росту [11]. Отримані експериментальні дані досліджень обробляли за допомогою дисперсійного аналізу на комп'ютері, застосовуючи прикладні програми Excel [12].

Результати досліджень. Після колхіцинування рослин в умовах *in vivo* протягом трьох поколінь видаляли диплоїдні рослини.

Зміни параметрів листової пластинки рослин стевії використовували як діагностичні ознаки поліплоїдних форм. Вимірювання листової пластинки селекційних номерів у поколінні F_1-F_3 та визначення відношення довжини до ширини листка свідчать, що листовий індекс значною мірою залежить від зміни рівня плоідності рослин (табл. 1). Листовий індекс тетраплоїдних форм варіював у межах від 2,5 до 2,9 та був достовірно вищим за листовий індекс диплоїдних і гексаплоїдних форм. Гексаплоїдні генотипи 66-1м-9 та 66-1м-16 мали значно нижчий листовий індекс (1,6 та 1,7), ніж контроль (2,1), а гексаплоїдні форми 66-3Н-3 та 66-3Н-8 (2,0 і 1,9) не відрізнялися від контролю.

Враховуючи достовірні відмінності параметрів листової пластинки у форм стевії різної плоідності, можна застосовувати як допоміжний критерій морфологічні показники для добору бажаних тетраплоїдних генотипів. Це дасть можливість на перших етапах виокремити тетраплоїди з великого обсягу селекційного матеріалу, вони відрізняються від диплоїдних і гексаплоїдних форм більшими розмірами листових пластинок.

Крім того, добір тетраплоїдів за морфологічними ознаками може ускладнюватись у зв'язку з модифікаційною мінливістю диплоїдних і тетраплоїдних форм стевії. Оскільки за цими особливостями виявлено великі відмінності між ними, то вони можуть бути маркерними ознаками для ідентифікації тетраплоїдів лише на ранніх етапах селекції, якщо ростуть в ідентичних умовах. Таким чином, анатомо-морфологічні ознаки є діагностичними для попереднього визначення

плоідності рослин, після чого необхідно проводити цитологічний аналіз плоідності.

Таблиця 1

Порівняльні параметри листової пластинки у вихідних номерів та поліплоїдів F_1-F_3 (*in vivo*) рослин стевії

Селекційний номер	Рівень плоідності	Показники		
		параметри листової пластинки, см		листовий індекс
		довжина	ширина	
1м (контроль)	22	7,1	3,4	2,1
44-1м-3	44	9,8	3,9	2,5
44-1м-7	44	11,6	4,2	2,7
44-1м-8	44	10,2	3,9	2,6
44-1м-12	44	11,5	3,9	2,9
66-1м-9	66	2,5	1,6	1,6
66-1м-16	66	2,3	1,3	1,7
3Н (контроль)	22	6,8	3,2	2,1
44-3Н	44	9,1	3,4	2,7
44-3Н-5	44	11,3	4,0	2,8
66-3Н-3	66	3,0	1,5	2,0
66-3Н-8	66	3,7	1,9	1,9
НІР ₀₅		2,1	0,9	0,3

Таким чином, морфологічні особливості є діагностичним засобом для масового вибіркового добору, вони є допоміжними для зменшення великого обсягу робіт, але вирішальними є цитологічні методи.

Після добору за морфологічними ознаками досліджували тетраплоїди за продиховим апаратом. Для стевії є характерним аноміцитний тип продихового апарату, навколо продишу розміщено 5–7 клітин, подібних до епідермальних [8].

На основі досліджень визначено розміри продихів та виявлено різну їх кількість на одиницю площі листової поверхні в разі зміни рівня плоідності (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика продихового апарату листя стевії

Генотип	Рівень плоідності	Розмір продихів, мкм		Кількість продихів на 1 мм^2
		довжина	ширина	
1м (контроль)	22	26	17	23
44-1м-3	44	38	20	12
44-1м-7	44	53	26	14
44-1м-8	44	51	27	12
44-1м-12	44	54	24	12
66-1м-9	66	31	18	17
66-1м-16	66	29	17	19
3Н (контроль)	22	21	18	20
3Н	44	51	30	12
44-3Н	44	54	25	13
44-3Н-5	44	52	22	12
66-3Н-3	66	42	20	16
66-3Н-8	66	37	19	17
НІР _{0,05}		1,6	1,1	2,4

Виявлено, що у тетраплоїдних клітин довжина продихів збільшується в 1,3–1,6 раза порівняно з диплоїдними формами та зменшується їхня кількість на 1 мм². У гексаплоїдних форм кількість їх також зменшується.

Добір поліплоїдів здійснювали, використовуючи як критерій добору розмір пилкових зерен. Як відомо, розмір пилку може варіювати залежно від умов вирощування, але рослини 4x і 6x, вирощені в ідентичних умовах, характеризуються більшим діаметром пилку. Тому ця особливість є допоміжним критерієм для ідентифікації тетраплоїдів.

У селекційного номера 1м (контроль) діаметр пилку був 18,7 мкм, у тетраплоїдів він коливався з 26,5 до 35,9 мкм. У вихідного номера 3Н діаметр пилку тетраплоїдів становив від 31,7 до 35,0 мкм порівняно з контролем – 17,2 мкм. Проте такий добір є можливим лише тоді, коли рослини стевії вступають у генеративну фазу розвитку, адже тетраплоїдні її форми частіше завершують період вегетації інтенсивним ростом, не утворюючи квітконосних пагонів. У тетраплоїдних рослин збільшуються розміри пилкових зерен порівняно з диплоїдними.

Як свідчать результати досліджень (табл. 3), розміри тетраплоїдного пилку варіювали в

межах 26,5–35,9 мкм. Проте параметри гексаплоїдного пилку селекційного номера 1м – 16,0 і 19,2 мкм були близькими до контролю (18,7 мкм). Аналогічна тенденція спостерігалася стосовно іншого вихідного генотипу – 3Н.

Таблиця 3

Варіювання величини пилкових зерен стевії

Номер поліплоїдних ліній	Рівень плоїдності	Діаметр пилку стевії, мкм
1м (контроль)	22	18,7
44-1м-3	44	26,5
44-1м-7	44	33,9
44-1м-8	44	35,9
44-1м-12	44	27,8
66-1м-9	66	16,0
66-1м-16	66	19,2
3Н (контроль)	22	33,5
44-3Н	44	35,0
44-3Н-5	44	31,7
66-3Н-3	66	19,4
66-3Н-8	66	19,8
НІР _{0,05}	–	4,2

Про доцільність проведення доборів тетраплоїдних рослин за морфологічними показниками свідчить те, що за кількістю хромосом (найточніший метод ідентифікації плоїдності) група добору в F₃ за розмірами продихів збігалася (див. рисунок).

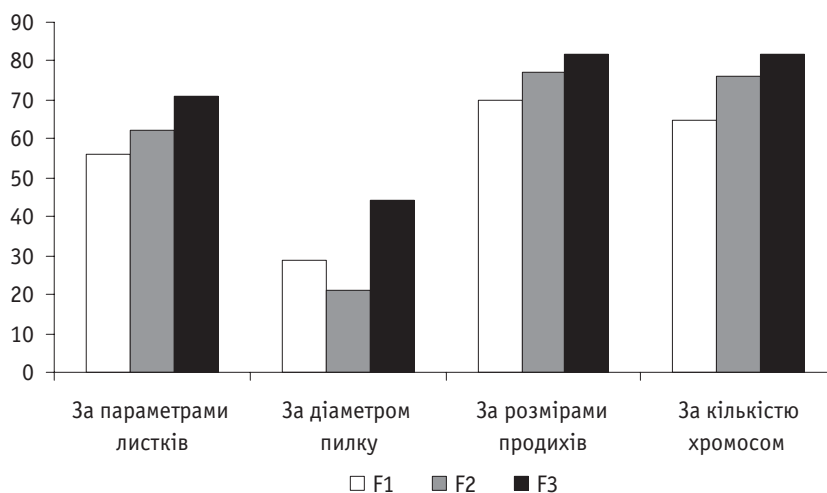


Рис. Ефективність проведення доборів тетраплоїдів за морфологічними та цитологічними ознаками в поколіннях F₁–F₃ стевії, %

За параметрами листків було відібрано в F₃ 71% рослин порівняно з 82%, відібраними за цитологічним контролем. За ознакою «діаметр пилку» ефективність добору була нижчою і становила в поколінні F₃ 44% порівняно з 82%. Тетраплоїдні форми стевії характеризувалися сповільненим розвитком і в F₀ поколінні вони закінчили свій період вегетації інтенсивним ростом. У зв'язку з цим неможливо їх ідентифікувати за характером

пилку. За діаметром пилку вибирали найбільше рослин в усіх поколіннях, хоча хромосомний аналіз цього не підтвердив.

За розмірами продихового апарату та за кількістю хромосом отримано наближені дані протягом поколінь F₁ і F₂, у кінці добору результати були однаковими й становили 82%.

Висновки. Таким чином, за великих обсягів селекційного матеріалу на початкових етапах селекції доцільно використовувати анатомо-

морфологічні показники як критерій добору тетраплоїдних форм стевії. Такими допоміжними критеріями добору (експрес-метод) є параметри листкової пластинки, розміри продихів і діаметр пилку. У тетраплоїдних форм стевії листковий індекс (відношення довжини до ширини листкової пластинки), а також розмір продихів і діаметр пилку є достовірно більшими порівняно з диплоїдними формами. Основним і найточнішим критерієм добору тетраплоїдних форм є визначення кількості хромосом на основі цитологічного аналізу, що доцільно використовувати у більш пізніх етапах добору.

Особливістю анатомо-морфологічних ознак тетраплоїдних форм стевії порівняно з диплоїдними є те, що їхній листковий індекс на 19–38% є більшим, кількість продихів на одиниці площі – на 39–48% меншою, діаметр пилкових зерен – на 42–92% більшим.

Використана література

1. Brendle J. E. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana* / J. E. Brendle, N. Rosa // Can. J. Plant Sci. – 1992. – Vol. 72. – P. 1263–1266.
2. Горбатенко Л. Е. Стевия – ценное пищевое и лекарственное растение / Л. Е. Горбатенко, О. О. Дзюба // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использова-

ния : материалы V Междунар. симпозиума (Москва, 24–27 июня 2003 г.). – М., 2003. – Т. 3. – С. 317–319.

3. Lewis W. H. Early uses of *Stevia rebaudiana* leaves as a sweetener in Paraguay / W. H. Lewis // J. Econ. Bot. – 1992. – No 46. – P. 336–337.
4. Induction and morpho-chemical characterization of *Stevia rebaudiana* colchiploids / A. K. Yadav, S. Singh, S. C. Yadav [et al.] // Indian Journal of Agricultural Sciences. – 2013. – Vol. 83, No 2. – P. 159–169.
5. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин : підруч. / М. Я. Молоцький, С. П. Васильківський, В. І. Князюк, В. А. Власенко. – К. : Вища освіта, 2006. – С. 175.
6. Бреславец Л. П. Полиплоидия в природе и опыте / Л. П. Бреславец. – М. : Наука, 1963. – 364 с.
7. Соловьёва Л. В. Практикум по цитологии / Л. В. Соловьёва. – М. : Изд-во Московского ун-та, 1982. – С. 49–52.
8. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae) [Электронный ресурс] / V. M. de Oliveira, E. R. Furni-Martins, P. M. Magalhães, M. N. Alves // Genet. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 27, No 2. – Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000200015>.
9. Ильенко И. И. Введение в культуру стевии – источника низкокалорийного заменителя сахара / И. И. Ильенко. – К. : ВНИС, 1990. – С. 74–78.
10. Баранова М. А. Классификации морфологических типов устьиц / М. А. Баранова // Бот. журн. – 1985. – Т. 70, № 12. – С. 1585–1595.
11. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
12. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – 5-е изд., доп. и перераб. – М. : Агропромиздат, 1985. – 351 с.

УДК 633.66

Г. В. Цвигун. Морфологические и цитологические признаки определения тетраплоидов стевии медовой // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2015. – № 1–2 (26–27). – С. 11–14.

Цель. Определить особенности анатомо-морфологических признаков растений стевии для ускорения идентификации тетраплоидных форм. **Методы.** Полевой, лабораторный и метод дисперсионного анализа. **Результаты.** Установлено, что характерной особенностью анатомо-морфологических признаков тетраплоидных форм стевии по сравнению с диплоидными является больший листовой индекс (19–38%), меньшее количество устьиц на единицу площади (на 39–48%), больший диаметр пыльцевых зерен (на 42–92%). **Выводы.** Вспомогательными критериями отбора (экспрес-метод) являются па-

раметры листовой пластинки, размеры устьиц и диаметр пыльцы. У тетраплоидных форм стевии листовой индекс (отношение длины к ширине листовой пластинки), а также размер устьиц и диаметр пыльцы являются достоверно большими по сравнению с диплоидными формами. Основным и самым точным критерием отбора тетраплоидных форм является определение количества хромосом на основе цитологического анализа, что целесообразно использовать на более поздних этапах отбора.

Ключевые слова: стевия, полиплоиды, тетраплоиды, гексаплоиды, листовой индекс, хромосомы.

UDC 633.66

H. V. Tsvihun. Morphological and cytological characters for defining *Stevia* 'Honeyleaf' tetraploids // Sortovyvchennia ta okhorona prav na sorty roslyn (Plant Varieties Studying and Protection). – 2015. – № 1–2 (26–27). – P. 11–14.

Purpose. Determination of peculiarities of anatomical and morphological characters of stevia plants to accelerate the identification of tetraploid forms. **Methods.** Field, laboratory and analysis-of-variance methods. **Results.** It was established that larger leaf area index (19–38%), fewer stomata per unit area (by 39–48%), larger diameter of pollen grains (by 42–92%) is a characteristic feature of anatomical and morphological characters of stevia tetraploid forms as compared to diploid ones. **Conclusions.** The parameters of leaf plate, the size of stomata and diameter of

pollen grains are auxiliary selection criteria (rapid test). For tetraploid forms of stevia, leaf area index (the ratio of leaf blade length to width), size of stomata and diameter of pollen grains is truly larger as compared to diploid forms. Chromosomes number determination based on cytological analysis is the major and the most accurate criterion for selection of tetraploid forms, that seems advisable to use it at later stages of selection.

Keywords: stevia, polyploids, tetraploids, hexaploids, leaf area index, chromosomes.

Надійшла 4.11.14