

УДК: 633.66

Г.В. ЦВІГУН, науковий співробітник

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ПОЛІПЛОЇДІ В СЕЛЕКЦІЇ СТЕВІЇ

Досліджено вплив різних концентрацій та експозицій колхіцину на вихід життєздатних пагонів із насіння та мікроживців стевії ди- і тетраплоїдного рівня. Отримано форми з різним рівнем геному, вивчена їх продуктивність. Перспективними для селекції виявилися тетраплоїдні форми.

Ключові слова: стевія, дитерпенові глікозиди, поліплоїдія, колхіцин, тетраплоїди, міксоплоїди.

Вступ. Стевія медова – перспективна культура, яку вирощують в багатьох країнах світу для отримання підсолоджувачів, які перешкоджають процесу бродіння, стійкі до високих температур, низькокалорійні, мають тривалий період зберігання. Такі властивості природних підсолоджувачів дозволяють широко застосовувати їх в фармацевтичній та харчовій промисловості. Крім того, ця культура має велике значення як цукрозамінник, який необхідний для хворих на цукровий діабет.

Солодкі глікозиди синтезуються в листках стевії, тому селекційна робота повинна бути спрямована на підвищення продуктивності вегетативної маси. Максимальну продуктивність внаслідок збільшення розмірів клітин та всієї рослини забезпечує поліплоїдія. Поліплоїдні популяції здатні підтримувати високий рівень гетерозиготності, що є основною умовою гетерозису [1]. Поліплоїдія є перспективним методом створення вихідного матеріалу стевії, який лежить в основі створення високопродуктивних сортів. У зв'язку з цим, доцільно підібрати для стевії такі способи кратного збільшення геному, за яких можна отримати максимальну кількість тетраплоїдних форм.

Як відомо, з літературних джерел, тетраплоїди отримують за різних способів колхіцинування залежно від фази розвитку рослин, обробляючи насіння, молоді рослини та квітконосні пагони. Враховуючи те, що стевія не завжди закінчує період вегетації утворенням квітконосних пагонів, в роботу було залучено два способи колхіцинування: обробка пророслого насіння шляхом замочування в розчині колхіцину та вирощування мікроживців на агаризованому живильному середовищі з колхіцином в умовах *in vitro*.

Метою нашого дослідження було експериментальним шляхом встановити оптимальну концентрацію алкалоїду для отримання поліплоїдів і відібрати кращі з них як вихідний матеріал для подальшої селекції.

Матеріали та методика досліджень. Вихідним матеріалом слугували ди і тетраплоїдне насіння та мікроживці різного рівня геному в умовах *in vitro*.

Для обробки насіння застосовували водні розчини колхіцину в концентраціях від 0,1 до 1,0%. Для цього насіння розміщували на зволоженому розчином колхіцину фільтрувальному папері в чашках Петрі на 48 і 72 год. Асептичні мікроживці вирощували на агаризованому живильному середовищі Гамборга з додаванням 0,01 – 0,1% концентрації колхіцину перед автоклавуванням, експозиція культивування від 5 і 10 діб. Після середовища з колхіцином переносили на середовище з фітогормонами.

Ідентифікували поліплоїдні рослини за морфологічними та цитологічними ознаками [2, 3].

Результати досліджень. Колхіциноване насіння стевії мало низьку схожість, енергію проростання та вихід життєздатних пагонів. Подальший ріст і розвиток досліджуваних рослин залежав від концентрації колхіцину та експозиції. Отримані результати наведено в табл.1. Контролем слугувала диплоїдна форма.

Оброблене тетраплоїдне насіння розчином в концентрації 0,1 – 0,2% тривалістю 48 годин утворювало життєздатні паростки, відповідно 84,2 та 60,7%, тому що воно не відчувало негативного впливу колхіцину. За концентрації 0,5% виживаність проростків дещо знизилася і становила 31,4%. Підвищення концентрації до 1,0% значно знизило вихід життєздатних пагонів (до 12,5).

Вихід життєздатних пагонів при колхіцинуванні пророслого насіння стевії, %

Рівень геному	Концентрація колхіцину, %			
	0,1	0,2	0,5	1,0
Тривалість обробки - 48 годин				
2п (контроль)	83,5	67,9	31,9	17,8
4п	84,2	60,7	31,4	12,5
Тривалість обробки - 72 години				
2п (контроль)	43,1	30,7	16,5	3,2
4п	36,8	18,2	9,4	0,9

Збільшення тривалості обробки насіння стевії колхіцином до 72 годин вдвічі зменшило вихід життєздатних пагонів за концентрацій 0,1 – 0,5%, а концентрація колхіцинування 1,0% виявилася летальною дозою. Токсична дія колхіцину призвела до сповільненого росту корінців та суттєвого зниження виходу життєздатних пагонів.

Культивування мікроживців стевії на живильному середовищі в присутності колхіцину призвело до зниження регенерації мікропагонів, про що свідчать дані табл. 2.

При 5 добовій експозиції 0,01% розчином колхіцину регенерація тетраплоїдних пагонів становила 89,1%. За концентрації 0,02% колхіцину вихід життєздатних пагонів становив 78,4%. Збільшення концентрації алкалоїду до 0,05% знижувало регенерацію мікропагонів до 43,0%. Найвища концентрація в 0,1% колхіцину мала негативний вплив на насіння, тому життєздатних пагонів у цьому варіанті було найменше – 28,2%.

Збільшення експозиції колхіцинування до 10 діб за всіх концентрацій призвело до істотного зниження регенерації пагонів. Критичними виявились концентрації 0,05 – 0,1%, за яких сформувався відповідно 4,5 і 2,3% життєздатних рослин. Такі мікроклони характеризувалися сповільненим ростом, листки були гофровано-закручені. При збільшенні експозиції та концентрації алкалоїду виявлено некроз точок росту, а з часом і всіх мікроживців. Тому їх пересажували на живильне середовище без колхіцину. Після цього їх стан стабілізувався.

Таблиця 2

Вихід життєздатних пагонів при колхіцинуванні мікроживців стевії на агаризованому живильному середовищі, %

Рівень геному	Концентрація колхіцину, %			
	0,01	0,02	0,05	0,1
Тривалість обробки – 5 діб				
2п (контроль)	78,7	66,9	37,2	25,6
4п	89,1	78,4	43,0	28,2
Тривалість обробки - 10 діб				
2п (контроль)	62,9	35,7	1,8	0,7
4п	76,6	58,3	4,5	2,3

Вивчення характеру мінливості ознак під впливом колхіцину дозволило виявити цінні високопродуктивні форми, які відрізнялися від контрольних рослин. В поколіннях F₁ – F₃ виділяли поліплоїдні форми, які відрізнялися від вихідної форми 1м за висотою рослин, кількістю основних пагонів, площею листової поверхні (рис.1).

За збільшення рівня плоїдності, висота рослин зростала, але до певної межі, в нашому випадку - тетраплоїдного рівня. Всі тетраплоїдні форми були високорослими, висота яких варіювала в межах від 72,4 до 102,3см, що вдвічі вище порівняно з диплоїдною формою - 46,0см. Тетраплоїди характеризувалися найбільшою площею листової поверхні та товщиною листових пластинок. Проте кількість основних пагонів зменшувалася.

Переведені на гексаплоїдний рівень рослини мали суттєво нижчі показники за висотою рослин та площею листової поверхні. Вони не є цінним матеріалом для подальшої селекційної роботи стевії.

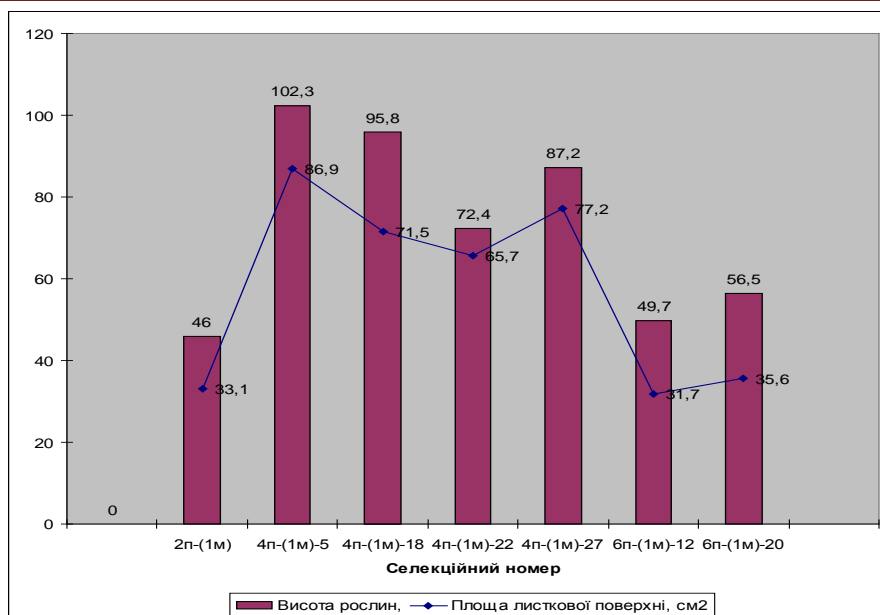


Рис. 1. Показники морфологічних ознак у поліплоїдних форм стевії порівняно з вихідною (1м)

Серед експериментальних рослин виявлено поліплоїдні форми, які характеризувалися зміненими параметрами морфологічних ознак порівняно з вихідним номером 172 (рис.2).

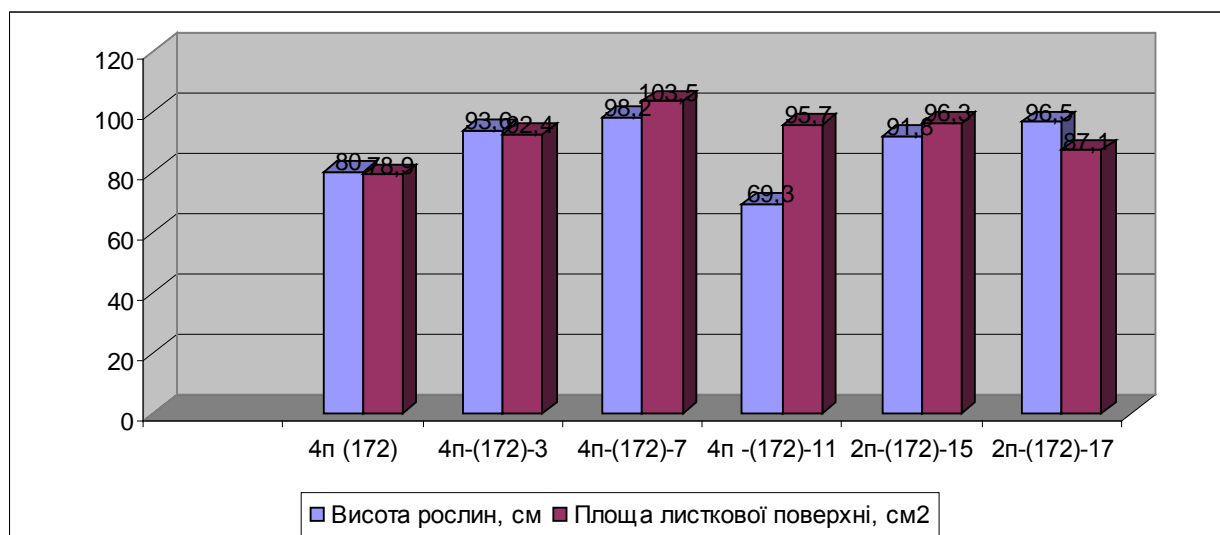


Рис. 2. Порівняльні показники морфологічних ознак у вихідного тетраплоїдного номера 172 та поліплоїдних форм стевії

Під впливом колхіцину виявлено морфо-біологічну варіабельність на відміну від вихідних форм, хоча кількість хромосом не змінювалася.

Виявлено поліморфізм у тетраплоїдних форм за висотою рослин, яка варіювала від 69,3 до 98,2см у вихідного селекційного номера 172. Отримані гексаплоїди від колекційного номера 172 в поколінні F₂ повернулися до тетраплоїдного рівня, але висота рослин істотно перевищила вихідну форму. З них відібрано два зразки, висота яких становила 91,8 та 96,5см, в порівнянні з вихідною формою, висота якої 80,0см.

За площею листової поверхні тетраплоїдні форми істотно переважали над диплоїдними та гексаплоїдними. Це спостерігали упродовж всіх років досліджень.

Насіння стевії після колхіцинування утворювало корінці, які одразу ж відмирили. На їх місці утворювалися нові слабкі кореневі волоски, рослини погано росли та розвивалися. Найбільша кількість поліплоїдів отримана за концентрації колхіцину 0,1% - 8% тетраплоїдів і 21% гексаплоїдів (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив колхіцинування пророслого насіння диплоїдних форм стевії на зміну плоідності стевії

Концентрація колхіцину, %	Тривалість обробки, год	Рослини-регенеранти з різним набором хромосом, %			
		22	44	66	Міксоплоїди
0,1	48	26	8	21	9
0,2		23		17	5
0,5		0	0	0	0
1,0		0	0	0	0
0,1	72	18	2	11	0
0,2		7	2	4	0
0,5		0	0	0	0
1,0		0	0	0	0

На основі проведеного цитологічного аналізу рослин стевії, отриманих із мікроживців шляхом колхіцинування, встановлено, що серед індукованих поліплоїдних рослин зустрічалися форми різної плоідності (табл.4). Проте максимальна кількість тетраплоїдів утворилася за концентрації колхіцину 0,2% упродовж 5 добового культивування. Також ця концентрація сприяла утворенню великої кількості міксоплоїдів, зокрема три сомиків.

Таблиця 4

Вплив колхіцинування мікроживців диплоїдних форм стевії на зміну плоідності стевії

Концентрація колхіцину, %	Тривалість обробки, діб	Рослини-регенеранти з різним набором хромосом, %			
		22	44	66	Міксоплоїди
0,01	5 діб	82	39	36	12
0,02		37	47	12	12
0,05		10	0	7	1
0,1		0	0	0	0
0,01	10 діб	93	19	25	0
0,02		17	12	32	0
0,05		62	0	0	0
0,1		0	0	0	0

Отримані тетраплоїди стевії вивчали за продуктивністю в умовах *in vivo*, кращі з них наведено на рис.3. Урожайність сухого листа тетраплоїдів коливалася в межах від 159,62 до 195,84% порівняно з контролем. Гексаплоїдні форми мали суттєво низьку врожайність сухого листа від 63,01 до 69,81%. Урожайність сухого листа стевії зі збільшенням плоідності зростає до тетраплоїдного рівня, а далі різко спадає. Стевія на тетраплоїдному рівні проявляє максимальну продуктивність

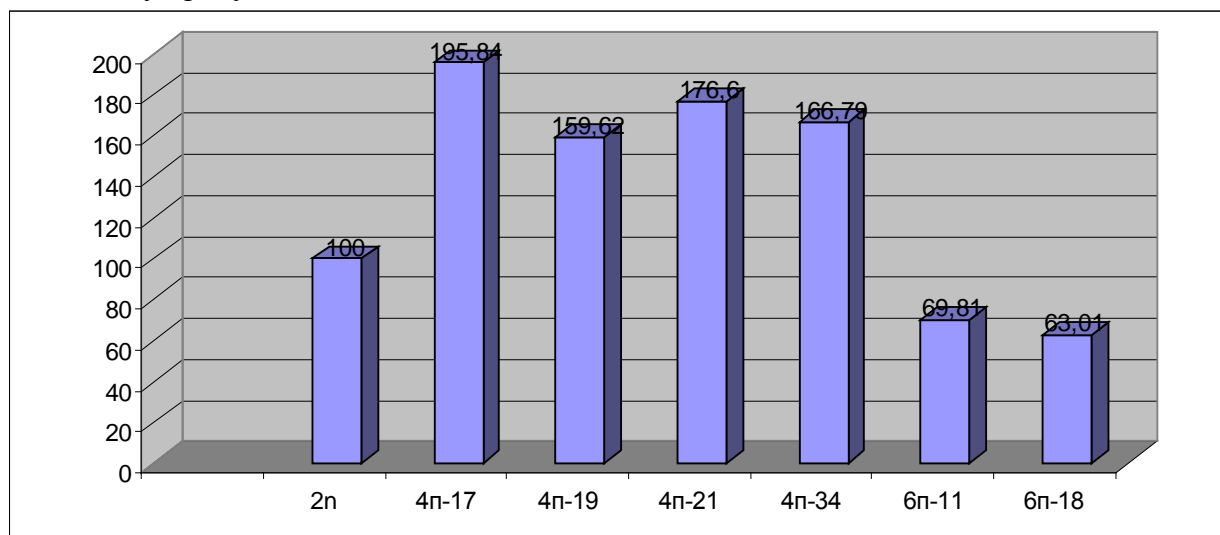


Рис. 3. Урожайність сухого листа кращих тетраплоїдних генотипів стевії, %.

Проведено аналіз на визначення вмісту дитерпенових глікозидів кращих тетраплоїдних і гексаплоїдних генотипів стевії, результати якого відображено на рисунку 4.

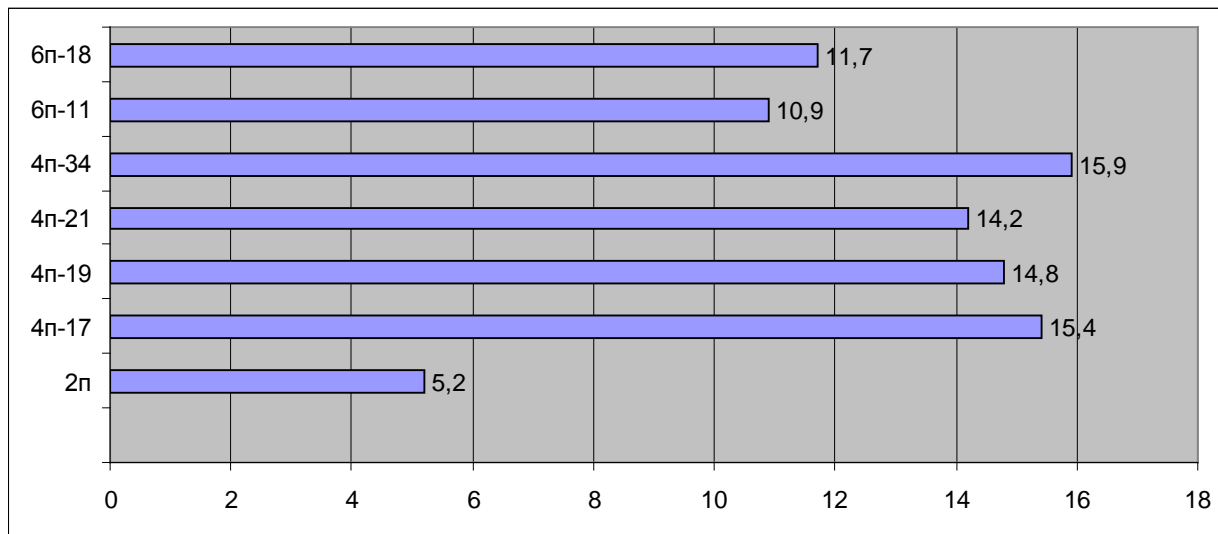


Рис. 2. Вміст глікозидів тетраплоїдних генотипів стевії, %

За результатами аналізу тонкошарової хроматографії визначено, що тетраплоїдні номери більш, ніж удвічі переважали диплоїдні за вмістом суми глікозидів. Гексаплоїдні також мали високі показники, в два рази вищі, ніж удиплоїдних. Незважаючи на це, гексаплоїдні форми не мають практичної цінності для подальшого селекційного процесу.

Висновки. Встановлено, що серед отриманих поліплоїдів найбільш ефективними виявилися тетраплоїдні форми. Найбільший вихід життєздатних пагонів отримано із диплоїдних мікророзривків при застосуванні колхіцину концентрацією 0,02% в складі агаризованого живильного середовища та експозиції 5 діб. Отримано тетраплоїдні форми, які перевищили контроль за урожайністю сухого листа на 66,79 – 95,04%, за вмістом дитерпенових глікозидів – на 9,6 – 10,7 %. Створено тетраплоїдні форми стевії, з них методом добору за продуктивністю виділено чотири перспективні лінії.

Список використаних літературних джерел

1. Дубинин П.П. Теоретические вопросы и достижения при использовании полиплоидии в селекции растений./ Дубинин П.П., Щербаков В.К./ Сб. «Полиплоидия и селекция». – М.-Л. «Наука», 1965, – С. 18.
2. Устьичный аппарат и пыльца как показатели плоидности растений/[Лаптев Ю.П., Макаров П.П., Глазова М.В., Шугаева Е.В.] Генетика, 1976. – Т.12. – №1. – С.47-55.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений/4 –е изд./ М., 1988. 271с.

Аннотація

Цвигун Г.В.

Использование метода полиплоидии в селекции стевии

Исследовано влияние различных концентраций и экспозиций колхицина на выход жизнеспособных побегов из семян и микрочеренков стевии ди- и тетраплоидного уровня. Получены формы с разным уровнем генома, изучена их производительность. Перспективными для селекции оказались тетраплоидные формы.

Ключевые слова: *стевия, дитерпенови глікозиди, поліплоїдія, колхіцин, тетраплоїди, міксоплоїди*

Annotation

Tsvigun G.V.

Using the methods of polyploidy in plant breeding Stevia

The effect of different concentrations of colchicine and displays the output of viable shoots from seed and stevia mikrozhvytsiv di-and tetraploid level. Retrieved forms with different levels of genome studied their performance. Promising for breeding were tetraploid forms.

Keywords: *stevia, dyterpenovi glycosides, polyploidy, colchicine, tetraploids, miksoploidy*