

УДК 634.524.02:582.998(571.63)

Ю.А. ХРОЛЕНКО, Т.Ю. ГОРПЕНЧЕНКО,  
М.С. ЯЦУНСКАЯ, М.В. РОМАШОВА, Е.Н. БАРСУКОВА

## Некоторые аспекты адаптации стеви *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni в Приморском крае в условиях новой агротехники

*Представлены технологии выращивания стеви в условиях плантации в Приморском крае. Установлены оптимальные сроки высадки рассады в открытый грунт, рельеф поля, схема посадки. Кариологический анализ показал, что пределы изменчивости по числу хромосом 9–33, наиболее часто встречающееся число хромосом  $2n = 22$ . Делается предположение о том, что соотношение клеток с разным числом хромосом (мозаицизм) является одним из факторов адаптации стеви к новой экологической нише.*

*Ключевые слова:* стевия, интродукция, Приморский край, агротехника, адаптация, число хромосом, кариотип.

**Some aspects of adaptation of stevia *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni in Primorsky Krai under the new agricultural techniques.** Yu.A. KHROLENKO, T.Yu. GORPENCHENKO, M.S. YATSUNSKAYA (Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS, Vladivostok), M.V. ROMASHOVA, E.N. BARSUKOVA (Primorsky Scientific Research Institute of Agriculture, Primorsky Krai, Ussuri district, Timiryazevskiy village).

*The technologies of stevia cultivation in a plantation in Primorsky Krai are presented. Optimal field planting time, field contour and planting plan are determined. Karyological study revealed that the variability limits for the number of chromosomes were 9–33 and the most frequent number of chromosomes was  $2n = 22$ . An assumption is made that the relationship of cells with a different number of chromosomes (mosaicism) is one of the factors of adaptation of stevia to the new ecological niche.*

*Key words:* stevia, introduction, Primorsky Krai, agrotechnics, adaptation, chromosome number, karyotype.

*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni – двулистник сладкий – многолетнее травянистое растение из сем. Asteraceae. Этот вид родом из Южной Америки, эндемик плоскогорий северо-восточного Парагвая. Интерес к новому для Приморского края растению, несомненно связан с наличием в нем соединений, обуславливающих сладкий вкус. Эти соединения в 50–400 раз слаще сахарозы, очень низкокалорийны и применяются при профилактике диабета и ожирения [15, 19]. Установлено, что наличие стевиозидов нормализует обмен веществ (белковый, углеводный, жировой), восстанавливает антиоксидантную функцию печени, улучшает процесс перекисного окисления липидов и не повышает содержание сахара в крови [10].

Стевию начали возделывать в странах Латинской Америки, Юго-Восточной Азии в конце 50-х годов прошлого столетия. Эта культура давно и успешно интродуцирована в

\*ХРОЛЕНКО Юлия Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ГОРПЕНЧЕНКО Татьяна Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ЯЦУНСКАЯ Маргарита Сергеевна – ведущий инженер (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток), РОМАШОВА Марина Викторовна – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, БАРСУКОВА Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией (Приморский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Приморский край, Уссурийский район, пос. Тимирязевский).  
\*E-mail: khrolenko@biosoil.ru

Японии. В нашей стране после первой, неудачной, попытки интродукции стевии Н.И. Вавиловым (привезенные им семена оказались невсхожими) была предпринята вторая попытка, успешная, на живых растениях. Экспедицией, организованной в 1970-е годы учеными Всесоюзного института растениеводства (ВИР), несколько растений стевии было привезено из Испании в Никитский ботанический сад (Ялта, Крым) [14]. В Российской Федерации стевия впервые включена в Государственный реестр селекционных достижений в 1995 г. как техническая культура. В настоящее время официально зарегистрировано и допущено к использованию во всех зонах России восемь ее сортов [13]. Один из них выведен во Всероссийском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург), два – в Ставропольском государственном аграрном университете, остальные – во Всероссийском НИИ сахарной свеклы (Воронежская область, пос. Рамонь). На территории Приморского края только в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии Приморского НИИСХ стевию выращивают с перспективой создания и районирования новых сортов в данной климатической зоне. В 2014 г. сорт стевии Приморская сладкая передан в Государственную комиссию по селекционным достижениям для районирования в Приморье.

Интродукцию растений влажных субтропиков в Приморье можно рассматривать как адаптацию к крайне суровым условиям, зачастую сопровождающуюся структурными перестройками кариотипа. В настоящей работе представлены технология выращивания стевии в Приморском крае в условиях плантации и результаты влияния агротехнологии на кариотип стевии в новой для нее климатической зоне.

## Материалы и методы

Для создания маточников использовали растения *S. rebaudiana*, имеющиеся в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии Приморского НИИСХ. Зеленые черенки получали от сохранившихся маточных растений предыдущей вегетации. Поддержание растений в культуре *in vitro* осуществляли по методике, разработанной сотрудниками Тимирязевской сельскохозяйственной академии [6] и ВНИИ сахарной свеклы [4], на питательной среде Мурасиге – Скуга (МС). Для адаптации растений применяли агротехнические манипуляции, направленные на выявление наиболее эффективных по урожайности, устойчивости к полеганию образцов. Цитологический анализ потомства, полученного от растений прошлогодней вегетации, проводился на клетках апикальной меристемы придаточных корешков. Корешки отбирались на микрорастениях стевии, выращенных *in vitro*. Для цитологии использовались стандартные методики, модифицированные применительно к данному объекту [12, 17]. Наблюдения проводили в течение 2 лет, в опыте обработано 50 экз. Для получения максимального числа делящихся клеток корешки микрорастений обрабатывали 0,2%-м раствором колхицина в течение 2 ч. В качестве фиксатора использовали уксуснокислый спирт (1 : 3). Перед окрашиванием материал протравливали 4%-ми железоммонийными квасцами. В ацетогематоксилине материал выдерживали в течение 6–12 ч при комнатной температуре. Для получения модального числа хромосом отобрали около 60 метафазных пластинок с хорошим расхождением хромосом, примерно такое же число пластинок задействовали в работе. При таком подходе стандартная ошибка не превышает 5 %. Готовые препараты фотографировали в масляной иммерсионной системе под микроскопом Axioskop-40 с помощью встроенной видеокамеры AxioCam HRC (Zeiss, Germany).

## Результаты и обсуждение

Стевия – однолетнее растение в условиях умеренного климата. Сложность возделывания стевии в Приморье, как и в других регионах России, заключается в том, что

корни растений погибают при температуре 0...2 °С. В результате на зиму ее необходимо выкапывать и переносить в теплицы, каждый год закладывая новые плантации рассадным способом [3, 11]. Размножение осуществляли зелеными черенками *in vitro* и в горшочной культуре. Микрорастения из пробирок сначала помещали в контролируемые условия культуральной комнаты (4 000 люкс, 24 °С, при фотопериоде 16/8), для акклиматизации в условиях *in vivo* высаживали в почву с созданием влажной камеры. Подростшие растения (13–16 см) в третьей декаде июня переносили в открытый грунт на уплотненные гребни по схеме 35 x 70 см. В течение лета осуществляли уход (полив и прополку) (рис. 1). Листья собирали вручную во второй декаде сентября, маточные растения выкапывали в первой декаде октября, до наступления осенних заморозков. В Ставропольском крае высадку рассады стевии в открытый грунт производят во второй половине мая, уборку – в конце августа [7]. В условиях Приморского края в связи с климатическими особенностями все сроки сдвигаются на 1 мес. и более.

Одновременно с отбором наиболее эффективных по урожайности и устойчивых к полеганию особей проводили оценку хромосомного полиморфизма. Кариологический анализ показал, что хромосомы изученных образцов мелкие от 1 до 3,5 мкм длиной. Изучение кариотипов мелкохромосомных видов растений имеет свои особенности и сложности, для этого разрабатываются специальные методические приемы [9, 18]. Такие хромосомы нельзя измерить с достоверной точностью, так как разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,5 мкм. В работе использовали современную цифровую систему записи изображений метафазных пластинок. Цифровые фотоснимки позволяют детализировать изображение путем увеличения его масштаба. При проведении кариологического анализа использовали митотические хромосомы на стадии поздней профазы; в это время они находятся в состоянии неполной конденсации, и их длина больше, чем на стадии метафазы. Установлено, что у двулистника сладкого есть хромосомы двуплечие и хромосомы с неопределенным положением центромеры.

При исследовании кариотипа стевии установлено, что число хромосом составляет  $2n = 22$  (рис. 2). Пределы изменчивости числа хромосом – 9–33, модальное число хромосом – 22. Наблюдается миксо- и анеуплоидия, в одних и тех же корешках наряду с указанным числом хромосом ( $2n = 22$ ) отмечались и другие, кратные основному числу  $x = 11$  и не кратные ему. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что стевия является диплоидом с основным числом  $x = 11$ . Наше определение соответствует установленному ранее числу хромосом для стевии ([16, 21]; <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>).



Рис. 1. Растения *Stevia rebaudiana* в открытом грунте

В результате изучения ядрышек в интерфазных ядрах (398 шт.) выявлено, что их число варьирует в пределах 1–3. Среднее количество ядрышек составляет  $1,264 \pm 0,025$ . Наиболее часто встречаются интерфазные ядра с 1 и 2 ядрышками (76 и 21 % соответственно), значительно реже – ядра с 3 ядрышками (3 %).

Формирование ядрышек обусловлено активностью определенных локусов хромосом – ядрышковых организаторов, чаще всего расположенных в районах вторичных перетяжек хромосом, где находятся гены,

контролирующие синтез рРНК и образование рибосом – пусковых механизмов синтеза белка [5]. По числу ядрышек, образующихся в телофазе митоза, можно судить о количестве нуклеолярных хромосом. По максимальному числу ядрышек в интерфазных ядрах можно определить количество ядрышкообразующих хромосом. Интерфазные ядра стевии содержат 1–3 ядрышка, что позволяет предположить наличие 1–2 пар нуклеолярных хромосом.

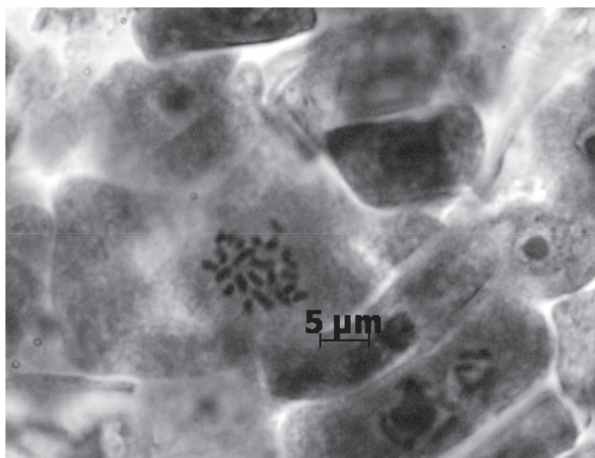


Рис 2. Кариотип *Stevia rebaudiana*  $2n = 2x = 22$

Из литературы известно, что у отдельных видов растений на границах ареалов и в интродукции закрепляются высокоплоидные цитотипы как наиболее адаптированные к суровым условиям [1, 2, 8, 20]. Однако, несмотря на наблюдаемую анеу- и миксоплоидию, стевия адаптируется к новой экологической нише на постоянной хромосомной основе в пределах генотипической нормы реакции.

Стевия – довольно прихотливая культура, и растения, выкопанные и пересаженные в горшки на зимнее хранение, даже при комнатных условиях весной не всегда способны просыпаться и давать побеги, поэтому культивирование *in vitro* является важным этапом в интродукции этого вида. Зимой растения сохраняют в пробирках путем многократных пассажей, а весной, когда появляется необходимость в большом количестве посадочного материала к определенному сроку, размножают путем черенкования. Методика микроклоновирования в данном случае позволяет не только преодолеть проблему пробуждения маточных растений, увеличить количество посадочного материала, но и создать генотипически однородное и высокопродуктивное потомство. Поскольку посадочный материал (рассаду) выращивают под светоустановками в культуральной, то необходимо иметь дополнительные площади, которые, к сожалению, отсутствуют. Это является основной проблемой расширения производства, как и высокая доля ручного труда, особенно при уборке и обдирке листа. В полевых условиях ежегодно высаживали около 2 тыс. кустов стевии на 4 сотках. Урожай листьев (сухая масса) составлял 25–35 кг в зависимости от погодных условий.

Высушенные и фасованные листья стевии пользуются спросом у населения не только Приморского края, но и других регионов Дальнего Востока, в частности на Сахалине, Камчатке. Многие уже не один год используют в своем рационе листья стевии, это в основном люди, больные сахарным диабетом, гипертонией, с повышенным содержанием холестерина в крови и др.

Таким образом, в полевых условиях разработана технология выращивания стевии в Приморье: установлены сроки и схема посадки, возраст рассады, рельеф поля (гребни). Кариологический анализ отобранных образцов показал, что стевия адаптируется к новой экологической нише на постоянной хромосомной основе. Воздействие климатических особенностей проявляется у растений на генетическом уровне в виде анеу- и миксоплоидии. Созданные условия позволяют стевии адаптироваться в пределах генотипической нормы реакции, поэтому она может и должна рассматриваться как потенциальная плантационная культура для нашего региона.

Наличие собственного источника таких перспективных сахарозаменителей, как стевииозиды, может послужить основой для развития смежных областей дальневосточной фармакологии и пищевой промышленности и, соответственно, принести несомненную пользу здоровью и улучшить качество жизни людей.

Отобранные по результатам проделанной работы образцы стевии успешно прошли сортоиспытание и определены как сорт Приморская сладёна (код 8558073), который включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (сорта растений) на 11.02. 2016 г. по всем регионам Российской Федерации (<http://www.gossort.com>).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Екимова Н.В., Муратова Е.Н., Силкин П.П. Роль полиплоидии в адаптации и расселении степных кустарников в Центральной Азии // Экол. генетика. 2011. Т. 9, № 1. С. 15–20.
2. Екимова Н.В., Хроленко Ю.А., Муратова Е.Н., Силкин П.П. Числа хромосом и кариотипы некоторых видов семейства Polygonaceae // Ботан. журн. 2009. Т. 94, № 2. С. 148–153.
3. Живчикова Р.И., Живчиков А.И. Выращивание стевии (двулистника сладкого) на российском Дальнем Востоке // Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: сб. науч. тр.: в 2 т. / РАСХН, ДВНМЦ, Примор. НИИСХ. Новосибирск: СО РАСХН, 2003. Т. 1. С. 247–249.
4. Ильенко И.И. Микрклональное размножение стевии в культуре *in vitro* // Введение в культуру стевии – источника низкокалорийного заменителя сахара: сб. науч. тр. / ВНИИ сахарной свеклы. Киев: ВНИС, 1990. С. 74–78.
5. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом. Л.: Наука, 1972. 211 с.
6. Корнилова О.В., Калашникова Е.А. Клональное размножение стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) // Изв. ТСХА. 1996. Вып. 1. С. 99–104.
7. Кривенко А.А., Донец И.А., Жабина В.И., Есаулко Н.А. Особенности технологии возделывания стевии в Ставропольском крае // Применение современных ресурсосберегающих инновационных технологий в АПК. Ставрополь: Параграф, 2013. С. 112–115.
8. Малахова Л.А., Амеленко В.П., Катаева Т.Н. Цитогенетические исследования редких растений в Томской области в СибБС – методическая основа сохранения их биоразнообразия // Вестн. Томского гос. ун-та. 2008. № 2. С. 73–82.
9. Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосомных организаций геномов мелкохромосомных растений // Генетика. 2009. Т. 45, № 11. С. 1516–1529.
10. Озерова В.М. Стевия / медовая трава против диабета. СПб.: Весь, 2005. 64 с. (Сер. Рецепты кладовых природы).
11. Ромашова М.В. Первый опыт выращивания стевии (двулистника сладкого) в Приморском крае // Достижения науки и техники АПК. 2008. № 6. С. 22–23.
12. Смирнов Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология. 1968. Т. 10, № 12. С. 1601–1602.
13. Стевия (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) // Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорты растений. М.: Росинформагротех, 2015. С. 108.
14. Шафферт Е.Э., Чеботарь А.А., Новикова В.М. Морфоанатомическая характеристика стевии (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley в связи с интродукцией на ЮБК // Цитолого-эмбриол. исследования высших растений: сб. науч. тр. Ялта: Никит. ботан. сад, 1992. Т. 113. С. 25–37.
15. Chang S.S., Cook J.M. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages // J. Agric. Food Chem. 1983. Vol. 31, N 2. P. 409–412.
16. Frederico A.P., Ruas P.M., Marin-Morales M.A., Ruas C.F., Nakajima J.M. Chromosome studies in some *Stevia* (Compositae) species from southern Brasil. // Bras. J. Genet. 1996. Vol. 19. P. 605–609.
17. Khrolenko Yu.A., Burundukova O.L., Lauve L.S., Muzarok T.I., Makhan'kov V.V., Zhuravlev Yu.N. Characterization of the variability of nucleoli in the cells of *Panax ginseng* Meyer *in vivo* and *in vitro* // J. Gins. Res. 2012. Vol. 36, N 3. P. 322–326.
18. Kirov I., Divashuk M., Van Laere K., Soloviev A., Khrustaleva L. An easy «SteamDrop» method for high quality plant chromosome preparation // Mol. Cytogen. 2014. Vol. 7, N 21. doi:10.1186/1755-8166-7-21.
19. Kujur R.S., Vishakha Singh, Mahendra Ram, Harlokesha Narayan Yadava, Singh K.K., Suruchi Kumari, Roy B.K. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats // Phcog Res. 2010. Vol. 2, N 4. P. 258–263.
20. Mandák B., Pyšek P., Lysák M., Suda J., Krahulcová A., Bímová K. Variation in DNA-ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic // Ann. Bot. 2003. Vol. 92. P. 265–272.
21. Oliveira V.M., Forni-Martins E.R., Magalhães P.M., Alves M.N. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae) // Genet. Mol. Biol. 2004. Vol. 27. P. 215–222.