

Н. А. Вечернина,  
О. К. Таварткиладзе

N. Vechernina,  
O. Tavartkiladze

## КУЛЬТУРА IN VITRO STEVIA REBAUDIANA BERT.

### IN VITRO CULTURE OF STEVIA REBAUDIANA BERT.

Стевия - *Stevia rebaudiana* Bert. (семейство сложноцветные) - эндемичный вид Парагвая, содержащая вещество "стевиозид", в 300 раз более сладкое, чем сахар. Впервые описано в 1899 г. парагвайским ученым доктором Бертони. Это - травянистый многолетник с ежегодно отмирающими и вновь отрастающими стеблями. Надземные стебли достигают высоты 80 см. Цветки мелкие, с белыми длинными краевыми лепестками. Большая часть листьев сидит супротивно, поэтому стевию называют еще двулистник сладкий. На своей родине растение приурочено к зоне почти тропического климата (высокогорье), но с довольно резкими колебаниями температуры. В зимние месяцы в пределах его ареала нередки ночные падения температуры, близкие к нулю, а местами и легкие заморозки.

Действующее вещество содержится во всех частях растения, но в основном в листьях, где его содержание доходит до 6-6.5% на сухой вес. Стевиозид может использоваться в пищевой промышленности как сахарозаменитель, в частности, при производстве диетических и диабетических продуктов питания.

Растения используют путем сбора надземной части. Уборка только надземной части за 2-3 укоса дает около 2000 кг (с 1 га дикорастущих зарослей).

Культура, будучи травянистым многолетником с используемой надземной частью, безусловно перспективна для интродукции. Об этом писал В. П. Алексеев (1959) и указывал на перспективность разведения стевии в субтропиках СССР.

В настоящее время стевию выращивают в промышленных масштабах во многих странах Азии, в Болгарии, на Украине, в Грузии, в России (Краснодарский край). Это растение можно выращивать в комнатных условиях.

Особенностью стевии является то, что размножается она исключительно вегетативным способом. Семена даже на родине имеют очень малую всхожесть. Обычные способы размножения: черенками, отрезками в нижних частях стебля или делением куста. Возможно хранение выкопанных корневищ в зимний период с последующей их весенней посадкой на плантации. В зависимости от плотности посадки, на 1 га необходимо от 50000 до 100000 штук растений. Получить такое большое количество посадочного материала обычными методами размножения потребует довольно длительного времени. Поэтому наряду с традиционными методами размножения используется культура тканей - мощный инструмент расширения возможностей вегетативного размножения (Voxus, 1989).

В отделе биотехнологии ЮСБС начаты эксперименты с целью изучения особенностей биологии развития и интродукции стевии в условиях Алтайского края.

Небольшие участки побегов стевии вводили в асептическую культуру путем стерилизации их в 0.1% растворе сулемы в течение 12 минут. Затем четырежды промывали стерильной водой и высаживали на агаризованную (0.8%) питательную среду Гамборга, содержащую 4.5% сахарозу и 3 мкМ НУК. Через 6-7 суток на базальной части микрочеренка появлялись корни и начинался рост апикальных или латеральных почек побега. Через 18-20 суток в культуральных сосудах (колбы емкостью 250 мл) растения стевии становятся полностью развитыми, имеют мощную корневую систему с 20-25 корнями у одного растения, корни имеют корневые волоски. На безгормональной среде тоже происходит укоренение черенков, но количество

корней на черенок значительно меньше (5-7 шт.), не происходит развития корневых волосков. Эти особенности корневой системы сказываются впоследствии на акклиматизации растений-регенерантов в почве в нестерильных условиях: лучшая приживаемость бывает у растений с более мощной корневой системой, имеющей корневые волоски.

В одной колбе емкостью 250 мл можно выращивать 10 штук растений. Когда они вырастают, нижние два междоузлия с корневой системой используют для высадки в почву, а оставшиеся верхние части побега разделяют на части с парой пазушных почек и каждую из этих частей вновь культивируют на той же питательной среде. При таком способе микроразмножения коэффициент размножения за один пассаж составляет 3-4.

Для увеличения коэффициента размножения, особенно на начальных этапах культивирования, в качестве эксплантов использовали листья и параллельно культивировали черенки с почками без листовой пластинки. Отсутствие листовой пластинки на микрочеренке не оказывало отрицательного влияния на рост и развитие побегов из почек. На листовой пластинке делали надрезы и помещали на питательную среду Гамборга, дополненную 3% сахарозой и 10 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП). Через 2-3 недели при культивировании в условиях фотопериода (16/8 часов свет/темнота) начиналась прямая регенерация почек. На одном экспланте регенерировало от 25 до 35 почек, что значительно увеличивало коэффициент размножения. В последующем пассаже регенерировавшие почки помещали на среду с 3 мкМ НУК, на которой развивались нормальные растения.

Очень ответственным моментом в получении посадочного материала методами *in vitro*, является перенос растений-регенерантов в почву. Часто растения-регенеранты гибнут именно на этом этапе микроразмножения. Для того, чтобы этот этап прошел успешно, необходимо создать оптимальные условия. Растения-регенеранты в культуральных сосудах находятся в течение всего процесса культивирования при повышенной влажности, поэтому устьица их не функционируют нормально, они всегда открыты. Происходит усиленная транспирация. В первую неделю после высадки в почву растениям создают условия повышенной влажности (например, просто укрыв их полиэтиленовой пленкой). Затем, через 6-7 суток, начинают постепенно открывать пленку: вначале на 2-3 минуты с интервалом в один час, а в последующие сутки доводят интервал времени, когда растения могут находиться без укрытия, до 30 минут и более. Обычно вся эта процедура занимает 7-8 суток. Этого времени для растений стевии достаточно, чтобы их устьица начали функционировать нормально.

В некоторых случаях микроразмножение растений *in vitro* осуществляют с использованием жидких питательных сред и подложек или мостиков из фильтровальной бумаги. Но при массовом размножении изготовление фильтровальных мостиков довольно длительный процесс. Поэтому лучше использовать различные нейтральные субстраты. В экспериментах со стевией вместо агара использовали перлитовый субстрат. Перлит помещали в колбу (2г в колбе емкостью 250 мл) и добавляли жидкую питательную среду (26 мл на 2г перлита). В таком виде колбы автоклавировали при 0.9 - 1.0 атм. в течение 30 минут. Использование перлита вместо агара при массовом размножении имеет ряд преимуществ: до 60% себестоимости питательной среды приходится на агар; экономится электроэнергия, так как нет необходимости нагревать питательную среду. Но самое главное - растения-регенеранты не имеют последствий витрификации - чрезмерного оводнения и нефункционирующий аппарат устьиц. Такие растения-регенеранты стевии были способны гораздо лучше переносить смену условий выращивания *in vitro* на *in vivo*. Перлитовый субстрат, оставшийся на корнях после извлечения растений из колб, обеспечивает в первые 2-3 недели выращивания *in vivo* растения минеральными веществами. Растения-регенеранты, полученные на перлитовом субстрате, приживаются в нестерильных условиях очень хорошо (100% приживаемость) и не требуют в первые сроки акклиматизации и в самый

критический момент этого процесса повышенной влажности.

Таким образом, методы *in vitro* могут служить основой для повышения эффективности размножения растений стевии - уникального источника природного сахарозаменителя - и интродукции их в условиях Алтайского края.

#### ЛИТЕРАТУРА

Алексеев В. П. "Медовая трава Каа-хэ" // Бюлл. ин-та чая и субтр. культур, 1956.- N1. - С. 168-169.

Boxus P. La multiplication *in vitro*, une biotechnologie interessante pour le developpement. Ses perspectives industrielle // Ann. Gembloux. - 1989. - 95. - N3. - P. 163-181.

---

#### SUMMARY

This report describes a successful regeneration and micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. by *in vitro* methods.