

УДК 634:581.143.6

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СТЕВИИ (*Stevia rebaudiata* Bertoni)

О.В. КОРНИЛОВА, Е.А. КАЛАШНИКОВА

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Разработана и предложена лабораторная технология клонального микроразмножения стевии (*Stevia rebaudiata* Bertoni) с использованием в качестве первичного экспланта сегментов стеблей с двумя пазушными почками. Изучена зависимость микроразмножения и укоренения микропобегов от гормонального баланса питательной среды. Зафиксировано отсутствие снижения всех параметров роста и коэффициента размножения при увеличении числа субкультивирований стевии в условиях *in vitro*.

Среди растений — продуцентов веществ заменителей сахара большой интерес представляет стевия (*Stevia rebaudiata* Bertoni). Это травянистый, корневищный многолетник семейства сложноцветных с ежегодно отмирающими и вновь отрастающими стеблями [5], который синтезирует и накапливает низкокалорийные вещества терпеновой природы — стевииозиды. Основной объект повышенного внимания к этому растению — комплекс водорастворимых терпеновых гликозидов с интенсивно сладким вкусом. Они содержатся главным образом в

надземной части растения, особенно в листьях. Гликозиды стевии — весьма сложный комплекс различных веществ, включающий стевииозид, ребаудиазиды А, В, С, D, Е, стевииозид А₃, стевииолбиозид, дулькозид В. Эти гликозиды различаются химической структурой и степенью сладости. Их содержание в листьях неодинаково, но явно преобладает стевииозид, поэтому часто весь гликозидный комплекс стевии называют стевииозидами. Сладость всего комплекса гликозидов стевии оценивается в среднем 300 единицами по отношению к сахарозе 2, 7,

9]. Формула стевיוзида $C_{38}H_{60}O_{18}$, содержание в растении (в листьях) — 6—8%. Доказано, что стевיוзиды травы двулистника сладкого (стевии) не имеют канцерогенного действия, они прошли успешные испытания на долгосрочную токсичность [7]. Ни стевюизид, ни даже сухие листья стевии не имеют неприятного привкуса, не обнаружено и медико-биологических противопоказаний к его использованию в составе пищевых и лекарственных средств. По характеру метаболизма в организме человека и запасам биологической энергии на единицу сладости стевюизид относится к низкокалорийным заменителям сахара [2]. Его хорошо переносят люди с диабетом, нарушенным обменом веществ, сердечно-сосудистыми и другими заболеваниями. Он легко растворим в воде и спиртах, термостойчив, имеет стабильные значения кислотности [3]. Возможно применение стевюзида для вывода из организма радионуклидов. Кроме того, гликозиды стевии отличаются способностью модифицировать и усиливать запах ароматизирующих композиций, применяющихся в производстве напитков и других продуктов [5], он стабилен в карбонизированных напитках [7].

В начале 70-х годов нашего столетия стевия была ввезена в Японию, где 5 лет в 60 научно-исследовательских институтах разрабатывали культуру стевии. Сейчас в Японии перерабатывают 1,5—2 тыс. т сухого листа ежегодно и применяют получаемый стевюизид вместо сахара в безалкогольных напитках, консервах, кондитерских изделиях, жева-

тельных резинках и других продуктах [3]. Из Японии культура стевии распространилась в разные страны.

Хотя стевия — растение тропическое, оно устойчиво к переохлаждению, что весьма важно для возделывания ее в климатических условиях нашей страны.

В последнее время наблюдается повышение интереса исследователей разных стран к способам размножения стевии в условиях *in vitro* и к использованию методов культуры ткани для разработки новых способов извлечения новых компонентов [4, 8, 9]. На основании литературных данных можно сказать, что использование методов культуры клеток, тканей и органов стевии ускоряет селекционный процесс и повышает его эффективность, обеспечивая быстрое размножение и оздоровление ценных генотипов, проведение селекции на клеточном уровне и сохранение генофонда.

Основной задачей нашей работы была разработка лабораторной технологии клонального микроразмножения стевии.

Методика

В качестве объектов исследования использовали растения *Stevia rebaudiana*, привезенные из Вьетнамо-русского центра по интродукции и селекции растений в 1994 г. на кафедру с.-х. биотехнологии Тимирязевской академии.

У стевии, выросшей в условиях теплицы, брали молодые боковые побеги высотой до 10 см, освободили от листьев и нарезали микрочеренки длиной до 1,5 см с двумя пазушными почками. Черенки помещали в марлевый мешочек и стерилизовали в 0,1% растворе диоксида

3 мин. Затем их промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой, удаляли потемневшие концы и помещали базальной частью вертикально на безгормональную агаризованную питательную среду Мура-сиге и Скуга (МС). Культивировали микрочеренки в пробирках в световой камере, где поддерживали постоянную температуру 25—26° С, освещенность 3—5 тыс. лк белыми люминесцентными лампами, фотопериод 16-часовой.

Для изучения влияния гормонов на побегообразование и укоренение стевии в условиях *in vitro* использовали материал, полученный в ходе ее клонального микроразмножения. Средняя длительность пассажа составляла 30 дней, в конце его осуществляли пересадку черенков с двумя пазушными почками и апексов побегов на свежую питательную среду МС. При изучении влияния гормонов на процесс клонального микроразмножения стевии применяли в качестве веществ цитокининового типа действия 6-бензиламинопурин (БАП) и кинетин в концентрации 0,1 мг/л, а из группы ауксинов — гамма-нафтилуксусную кислоту (НУК) 0,05 мг/л.

При определении влияния различных ауксинов на процесс ризогенеза использовали: бета-индолилмасляную кислоту (ИМК) — 0,2 мг/л, индолилуксусную кислоту (ИУК) — 0,5; НУК — 0,2 мг/л. Основная среда при этом содержала минеральные соли по прописи МС, тиамин-НСl — 0,1 мг/л, пиридоксин-НСl — 0,1, никотиновую кислоту — 0,1 мг/л, сахарозу — 2%, агар — 0,7%.

Результаты

Пазушные почки, изолированные из растения, хорошо переносили об-

работку стерилизатором, точка роста оставалась жизнеспособной и асептической. Это позволило быстро ввести в стерильную культуру необходимое количество микрочеренков. Проблемы, связанные с освождением исходного материала стевии от фитопатогенной инфекции, рассматривали также и другие исследователи [4, 9].

На первом этапе эксперимента был осуществлен подбор компонентов питательной среды, обеспечивающих оптимальную активацию роста существующих меристем. Для этого были использованы питательные среды с разным содержанием гормонов цитокининового типа действия. Так, введение в среду культивирования по 0,1 мг БАП и кинетина на 1 л вызывало побегообразование (табл. 1). Вместе с тем эти соедине-

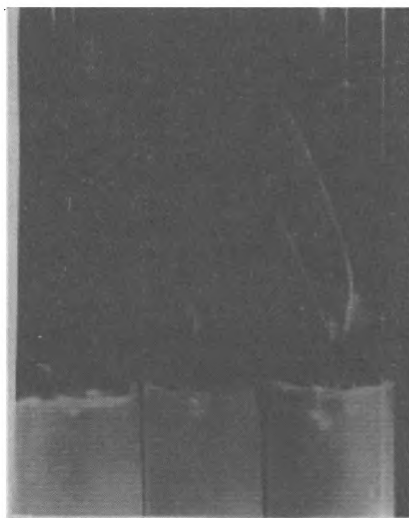


Рис. 1. Поэтапное образование микропобегов из пазушных почек стевии *in vitro* (первичный эксплант — сегмент стебля с двумя пазушными почками).

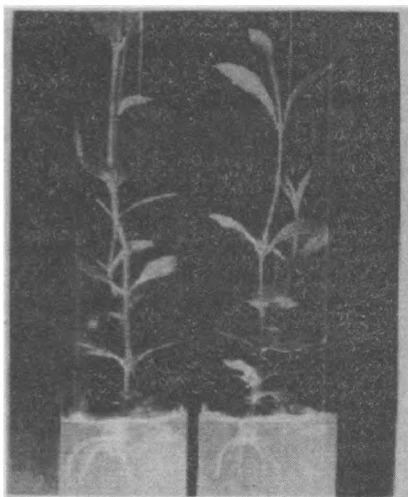


Рис. 2. Укоренение микропобегов стевии на среде МС, содержащей ИУК в концентрации 0,5 мг/л.

ния не влияли существенно на среднее количество активно растущих побегов. В варианте с БАП в среднем высота побегов была на 2,6 см, а количество междоузлий — на 3 шт. больше, чем в варианте с кинетином. Варианты с безгормональной средой не уступали по всем параметрам вариантам с гормонами. Среднее количество междоузлий в первом случае в среднем 9 шт., в последнем — 10 шт., высота побегов — соответственно 6 и 6,7 см (рис. 1). При этом среднее количество активно растущих побегов в расчете на растение было примерно одинаковым во всех вариантах.

При изучении влияния различных ауксинов на укоренение микропобегов стевии было выяснено, что

Т а б л и ц а 1

Активация развития пазушных почек при введении гормонов в питательную среду (средние данные)

Вариант	Кол-во активно растущих побегов, шт.	Высота побегов, см	Кол-во междоузлий, шт.	Спонтанное укоренение микропобегов, %
БАП + НУК	1,91	9,36	10,08	0
Кинетин + НУК	1,79	6,7	7,15	1,88
Без гормонов	2,38	5,92	9,42	24

наиболее эффективным является НУК в концентрации 0,5 мг/л: укоренение в этом варианте 61,1%, на среде с ИМК — 41,2, с НУК — 2,38% (табл. 2). Максимальные средняя длина корней (до 1,2 см) и число корней на микропобег (до 4 шт.) также оказались в варианте с ИУК (рис. 2), в котором первые корни появились уже через 2 нед культивирования, а в варианте с НУК и ИМК — значительно позже. Имеются данные [9], что НУК в концен-

трации 0,2 мг/л вызывает укоренение микропобегов уже через 4 дня. В нашем эксперименте этого не наблюдалось. Представляет интерес тот факт, что во всех вариантах образование каллуса происходило в основании стебля, где черенок соприкасался со средой культивирования. Это не препятствовало образованию и росту корней в вариантах с ИУК и НУК. Особо следует отметить реакцию стевии на наличие в среде культивирования

ИМК. В данном варианте образование микропобегов из пазушных почек составило 45,3%, а высота их не превышала в среднем 4 см (на среде с НУК — 15,3, с ИУК — 13,2 см), укоренилось 41,2% черенков, но сформировавшиеся корни были короткими (в среднем 0,6 см) и часто развивались аномаль-

но. Все свободное пространство пробирок было занято рыхлым, светлым и сильно обводненным каллусом.

В результате анализа развития пазушных почек и формирования микропобегов стевии в течение 5 субкультуриваний было выявлено, что на всем протяжении выращивания

Т а б л и ц а 2

Укоренение микропобегов стевии при введении в среду веществ ауксинового типа действия (средние данные)

Ауксин и его концентрация, мг/л	Укоренение микропобегов, %	Длина корней, см	Кол-во корней на один микропобег, шт.	Высота растения, см
НУК, 0,2	2,38	1,16	0,04	15,3
ИУК, 0,5	61,1	1,17	4,27	13,21
ИМК, 0,2	41,2	0,62	0,41	3,9

ния стабильными оставались средние значения высоты побега и число междоузлий, а также уровень спонтанного ризогенеза (табл. 3). Эта особенность роста черенков на безгормональной среде МС является очень важной для микроклонального размножения стевии, поскольку без использования гормонов и любых других способов активации роста и корнеобразования можно получать результаты, сопоставимые с наблюдаемыми при использовании ИУК и БАП. Во многих литературных источниках [1, 6] указывается на снижение коэффициента размножения и других параметров роста по мере увеличения числа пассажей. Однако существуют растения, у которых эффект такого рода отсутствует, причем стевия относится к их числу. Используя метод клонального микроразмножения, уже сейчас можно получать от одного растения стевии 9—10 растений (в пробирке) в течение месяца. Учитывая,

что побеги образуются из всех почек на черенках, посаженных на безгормональную среду, в год от одного черенка стевии с двумя пазушными почками можно получить в среднем 2×10^5 растений.

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что *Stevia rebaudiana* В. успешно вводится в культуру *in vitro* путем стерилизации диатидом черенков с пазушными почками. Показано, что при выращивании черенков стевии на безгормональной среде Мурасиге — Скуга коэффициент размножения, укоренение, количество междоузлий и другие параметры роста соответствуют тем, что получают при внесении в среду веществ гормонального типа. Поэтому микроразмножение стевии целесообразно проводить именно на безгормональной среде, как наиболее дешевой и эффектив-

Клональное микроразмножение стевии в зависимости от числа субкультивирований (средние данные)

Номер пассажа	Высота побегов, см	Кол-во междоузлий, шт.	Спонтанное укоренение микропобегов, %	Коэффициент размножения, %
I	4,78	6,85	29,3	9,85
II	8,78	9,19	17,8	10,7
III	4,58	8,95	21,95	9,52
IV	5,92	9,42	24,0	10,48

ной. Вместе с тем установлено, что в качестве активатора ризогенеза для микрочеренков стевии хорошие результаты дает ИУК в концентрации 0,5 мг/л. При использовании ряда гормонов цитокининового типа не выявлено существенных их различий по значению коэффициента размножения стевии. Зафиксировано отсутствие снижения параметров роста при увеличении числа субкультивирований стевии *in vitro*. В результате экспериментов разработан и предложен лабораторный способ размножения стевии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. — 2. Зубенко В.Ф. Новый природный заменитель сахара. — Вестн. с.-х. науки, 1990, № 3, с. 93—96. — 3. Зубенко В.Ф., Чудновский Б.Д. Рождение новой отрасли. — Сахарная свекла: производство и переработка, 1990, № 5, с. 49—50. — 4. Ильенко И.И. Микроклональное размножение стевии

в культуре *in vitro*. — Сб.: Введение в культуру стевии — источника низкокалорийного заменителя сахара /ВНИИ сах. свеклы. Киев, 1990, с. 74—78. — 5. Корниенко А.В., Жужалова Т.П., Знаменская В.В., Булавин Н.И. Перспективный заменитель сахара. Сах. свекла, 1993, № 1, с. 35. — 6. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и геномной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. М.: МГУЛ, 1993, с. 5—7, с. 38—65. — 7. Цанава В.П., Сарджвеладзе Г.П., Харебава А.Г. Влияние некоторых технологических приемов на состав летучего комплекса травы двулистника сладкого. — Субтропич. культуры, 1991, № 3, с. 64—70. — 8. Ferreira C.M., Handro W. — Plant Cell Reports, 1988, vol. 7, p. 123—126. — 9. Lyuknovkin A.G., Tran Dink Long, Titov D.A., et al. — Cultivation and utilization of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Hanoi: Agricultural Publishing House, 1993.

SUMMARY

Laboratory technology for clonal microreproduction of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) using stem segments with two axillary buds as a primary explant has been developed and suggested. Dependence of microreproduction and rooting of microsprouts on hormonal balance of nutrient medium has been studied. No reduction of all growth parameters and reproduction coefficient with higher number of stevia subcultivations *in vitro* has been fixed.