

УДК 582.998:633.88:[581.522.4+581.95]:[712.253:58:069.029](477-25)

Д.Б. РАХМЕТОВ¹, Н.Я. ЛЕВЧИК¹, Л.М. ШПАК¹, В.П. ГРАХОВ¹,
О.М. БОЙКО¹, А.В. ЛЮБІНСЬКА¹, С.О. РАХМЕТОВА¹, В.М. ЗАВГОРОДНІЙ²

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1

² Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041 м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

ІНТРОДУКЦІЯ РОСЛИН *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI В НАЦІОНАЛЬНОМУ БОТАНІЧНОМУ САДУ ІМ. М.М. ГРИШКА НАН УКРАЇНИ

Наведено результати багаторічних досліджень *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, зокрема особливості морфології рослин та розмноження, компонентний склад та прийоми культивування. Рослини характеризуються цінними лікарськими і харчовими властивостями та є перспективними інтродуцентами в Україні. В НБС ім. М.М. Гришка НАН України створено генофонд, який нараховує понад 20 форм. Розроблено умови та підібрано поживні середовища для введення в культуру і тривалого зберігання рослин в умовах *in vitro*, а також для їх регенерації з листових експлантів. Визначено вміст антиоксидантів (флавоноїдів та аскорбінової кислоти) у фітосировині стевії. Встановлено, що у листках *S. rebaudiana* накопичується в середньому близько 6-7 % (від абс. сухої маси) дитерпенових глікозидів. Це динамічний показник, який залежить від форми та умов культивування. Максимальне накопичення стевіозидів спостерігається у рослин відкритого ґрунту в фазу бутонізації. Рослини *S. rebaudiana* незалежно від форми та умов культивування (відкритий та захищений ґрунт, *in vitro*) характеризуються низьким рівнем посухостійкості. Рослини, які зростають у ґрунтових умовах, відрізняються вищою посухостійкістю порівняно із рослинами, котрі зростають в умовах *in vitro*. Найбільшу водоутримувальну здатність, як у ґрунтових умовах, так і в умовах *in vitro*, встановлено у форми R100, найменшу — у формі 3Т.

Ключові слова: інтродукція, *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, стевіозиди, флавоноїди, аскорбінова кислота, тривале депонування, посухостійкість.

Стевія (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) — одна з наймолодших сільськогосподарських культур у сучасному рослинництві. В країнах Південно-Східної Азії та Латинської Америки її почали вирощувати в кінці 50-х років ХХ ст. Пізніше вона була інтродукована в США і країни Південної Європи. Стевію промислово вирощують у Східній Азії (Китай (з 1984 р.), Японія, Республіка Корея), Південно-Східній Азії (Тайвань, Таїланд, Малайзія), Індії та Південній Америці (Бразилія, Колумбія, Перу, Парагвай, Уругвай) [34, 36], а також у Канаді, США, Мексиці та Ізраїлі. Найбільшими експортерами очищених екстрактів та препа-

ратів стевії (Enliten[®], Pure Via[™], Reb A, Rebi-ana, Stevia Extractin the Raw[™], Stevia cane[®], Sweet leaf Sweetener[™]) є Китай, США, Республіка Корея та Японія [8, 29].

Стевія є перспективною рослиною для введення в культуру в Україні. Її вирощування обмежене територіально, а валовий збір листків становить декілька десятків тонн. Однак ця культура має великий адаптивний потенціал, здатна формувати більшу врожайність листової маси.

Особливе значення має соціальний аспект вирощування стевії. Значне техногенне забруднення довкілля у другій половині ХХ ст. призвело до різкого зростання кількості захворювань, пов'язаних з порушенням обміну речовин. Діабет, ожиріння, алергічні стани

© Д.Б. РАХМЕТОВ, Н.Я. ЛЕВЧИК, Л.М. ШПАК,
В.П. ГРАХОВ, О.М. БОЙКО, А.В. ЛЮБІНСЬКА,
С.О. РАХМЕТОВА, В.М. ЗАВГОРОДНІЙ, 2016

притаманні для всіх вікових груп, але особливо різко зростає кількість хворих дітей. На думку лікарів-дієтологів, одним із чинників, який спричиняє виникнення таких захворювань, є надмірне споживання цукру. У зв'язку з цим у харчовій промисловості почали застосовувати замінники цукру. Штучні підсолоджувачі (аспартам, цикламат тощо) переважають цукор за солодкістю у десятки, сотні, тисячі разів, але для їх метаболізму в організмі не потрібен інсулін і вони не впливають на рівень цукру в крові. На жаль, усі вони чинять багато побічних негативних ефектів [29].

Натуральні підсолоджувачі (фруктоза, ксиліт, сорбіт, маніт та ін.), як і цукор, споживаються у досить великих кількостях, але мають в 1,5–2,0 рази меншу, ніж у цукру, енергетичну цінність. На особливу увагу заслуговують глікозиди стевії — стевіозиди. Вони не лише замінюють цукор (листки стевії у 15–20 разів, а стевіозиди — у 200–400 разів солодші за цукор) [19, 20], а й знижують концентрацію глюкози в крові та асоціюються з низкою інших позитивних впливів на організм людини. Стевіозиди засвоюються організмом, але калорійність їх незначна.

Клінічними дослідженнями встановлено, що вживання стевіозидів навіть у дозах, які у 50 разів перевищують фізіологічні, не призводило до жодних патологічних змін в організмі піддослідних тварин [34].

У природній флорі *S. rebaudiana* трапляється на напівпосушливих територіях від рівнин до гірських районів Південної та Центральної Америки, на північ до Мексики. Протягом багатьох століть індіанці племені гуарані, які проживали на території сучасних Бразилії та Парагваю, застосовували в їжу деякі види стевії, віддаючи перевагу *S. rebaudiana*, яку називали «*ka'ahe*» («солодка трава» або «медова трава»), як підсолоджувачу для трав'яних напоїв та гірких цілющих лікарських засобів. Листки стевії в поєднанні із тонізуючими рослинами є неодмінним компонентом традиційного парагвайського напою «мате» [34].

Уперше стевію було досліджено в XVI ст. лікарем та професором ботаніки Petrus Jacobus

Stevus (іспанською — Pedro Jaime Esteve), який працював в університеті Валенсії. На його честь рослина отримала латинську назву [30].

Першим повідомив про застосування стевії у харчуванні індіанцями гуарані доктор, директор агрономічного коледжу в Асунсьйоні (столиці Парагваю) Мойзес Бертоні в 1837 р. Зацікавлений розповідями про незвичайну рослину, солодку на смак, отримавши у подарунок від місцевого священника живий екземпляр стевії, Бертоні почав її досліджувати [29].

Стевію було відкрито вдруге у 1887 р. ученим-натуралістом, відомим ботаніком італійсько-швейцарського походження Антоніо Бертоні під час експедиції в Парагвай [31]. Виявилось, що це новий представник роду стевії. А. Бертоні назвав його на честь свого приятеля-хіміка, доктора Овідія Ребауді, який допомагав отримати екстракт. Таким чином, латинська назва стевії — *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. В 1900 р. Овідій Ребауді першим провів хімічний аналіз стевії та відкрив у ній солодку сполуку — глікозид. У 1918 р. Бертоні детально описав стевію та дійшов висновку, що «стевія не лише не токсична, а, навпаки, дуже корисна для здоров'я, як це показали досліді доктора Ребауді».

У 1908 р. стевію почали культивувати. Того ж року було отримано перший урожай сухих листків — майже 1 т. У 1920 р. рослину почали вирощувати на великих плантаціях у Бразилії та Парагваї.

У 1931 р. два французькі хіміки — М. Брідель та Р. Лавей виділили зі стевії глікозиди, які надають їй солодкого смаку. Екстракти, які отримали назву «стевіозиди» та «ребаудіозиди», виявилися солодшими за сахарозу в 250–300 разів та не спричиняли виражені побічні дії і токсичні ефекти у різних груп експериментальних тварин [34].

У 1934 р. М.І. Вавилов привіз із парагвайської експедиції насіння стевії. В своєму листі уряду вчений повідомив про унікальні лікарські та смакові властивості цієї рослини, наголошуючи на можливості використання стевії в харчовій промисловості як цукрозамін-

ника. Проте через репресії програму «Стевія» було відкладено на довгі роки [4].

Під час Другої світової війни внаслідок блокади німецькими підводними човнами шляхів постачання із Америки в Англії виник дефіцит цукру. Тому в країні почали пошук природного заміниці цукру, який можна було б вирощувати на британських островах. Дослідження доктора Мельвілля показали, що *S. rebaudiana* може бути такою культурою. У 1942 р. із Парагваю було отримано насіння стевії і почались експерименти з її вирощування в кліматично м'яких районах Англії. Проте з невідомих причин проект було закрито [4, 29].

У 1954 р. уперше в світі в Японії почали вирощувати стевію в тепличних умовах. У 1969—1971 рр. японський учений Тетсуя Суміда займався постачанням насіння стевії в Японію та був відповідальним за її культивування в регіонах Японії. Держава підтримала програму інтродукції стевії із Парагваю. Японці назвали цей процес «зеленою революцією». В 1971 р. китайському вченому Тей Фу Чену, який дослідив стародавні манускрипти китайських імператорів, вдалося методом екстракції стевіозиду із рослинної сировини позбутися небажаного кольору та гіркуватого присмаку листків стевії. У 1970-х роках завдяки токсикологічним дослідженням, проведеним в Японії, США та Кореї, які довели безпечність, немутагенність і користь тривалого вживання стевії, почали масово застосовувати стевію та стевієвмісні продукти у харчуванні [4, 29].

У 1980-ті роки у Радянському Союзі активно почали досліджувати та впроваджувати стевію. Було ухвалено програму під грифом «секретно» з адаптації стевії до умов помірного клімату, а також поставлено завдання — розробити продукти з неї для харчування космонавтів, спецслужб, підводників та еліти. Експерименти з адаптації проводили в усіх республіках, проте розвиток ця програма отримала лише в Україні. В 1984 р. декілька рослин стевії було завезено на територію України, а в 1985 р. у Всесоюзному науково-дослідному

інституті цукрових буряків (м. Київ) розпочато наукову роботу з цією культурою [10].

З 1986 р. стевію вирощують на території України. Тривалий час розробкою технології вирощування стевії та дослідженнями властивостей стевіозидів займалися в Нікітському ботанічному саду (м. Ялта). В ближньому зарубіжжі стевію почали вирощувати в 1987 р., коли науковці з Нікітського ботанічного саду передали досвід з агротехніки вирощування і посадковий матеріал стевії в Узбекистан, а в 1991 р. — у Росію [4, 10].

Цікаво, що з 1997 р. Пентагон повністю замінив цукор на стевію в раціоні харчування армії США. Японія стала другою батьківщиною стевії, оскільки 90 % світового урожаю сухих листків використовують в їжу японці [29].

У 1990 р. на 9-му Всесвітньому симпозиумі з проблем цукрового діабету і тривалості життя стевію було нагороджено золотим призом, як рослину, яка підвищує рівень біоенергетичних можливостей людини та сприяє активному довголіттю. Стевія має лікувально-профілактичну дію при цукровому діабеті, порушеннях роботи шлунково-кишкового тракту, ожирінні, атеросклерозі. Вживання стевіозидів запобігає розвитку гіпоглікемічних та гіперглікемічних станів, а отже, нормалізує обмін речовин [34]. Стевія має також інші лікувальні властивості: підвищує імунітет, виводить з організму токсини і радіонукліди, завдяки вітаміну С, β-каротину, мінералам, Zn, Se чинить антиоксидантну та загальнотонізуючу дію, сповільнює процеси старіння [19, 20, 29].

На думку провідних дієтологів, глікозиди стевії є найбільш корисними перспективними підсолоджувачами: вони мають високий коефіцієнт солодкості, низьку енергетичну цінність, стійкі до нагрівання, легко розчиняються, дозуються, не чинять негативного впливу на організм [15, 34, 35].

Дитерпенові глікозиди стевії виявляють гіпоглікемічну дію, протизапальні, репаративні і бактерицидні властивості, сприяють зниженню артеріального тиску, нормалізують функції імунної системи, захищають організм від шкідливого впливу стресу, запобігають

розвитку багатьох захворювань, зокрема відіграють важливу роль у лікуванні жіночих захворювань [34]. Антиоксидантні гідроксикоричні кислоти та флавоноїди зміцнюють судинні стінки, зменшують проникність і ламкість капілярів, посилюють скорочення серцевого м'яза, нормалізують процеси травлення, запобігають росту патогенних мікроорганізмів у кишечнику.

У 2004 р. експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я затвердили стевію як харчову добавку, а у 2006 р. визнали безпечність стевії. З огляду на результати досліджень дитерпенових глікозидів стевії на тваринах і людях, немає підстав вважати стевіозид і ребаудіозид генотоксичними та канцерогенними сполуками. У 2007 р. стевію було занесено в Codex alimentaris, що свідчить про відповідність міжнародним стандартам безпечності. У 2010 р. Європейським управлінням з безпеки харчових продуктів прийнято рішення про безпечність використання стевіолглікозидів як харчової добавки в європейській харчовій промисловості [29].

Стевіозид, який кількісно переважає ребаудіозид А в листках стевії, має такі недоліки, як гіркуватий присмак та солодкий післясмак. Тому нині намагаються досягти максимального вмісту ребаудіозиду А у препаратах підсолоджувачів шляхом очищення або використання генно-інженерної стевії, яка продукує майже чистий ребаудіозид А [29].

U.S. Food and Drug Administration (FDA) у 2008 р. через високу безпечність постійного вживання очищеного ребаудіозиду А як підсолоджувача дозволив широке використання його в харчовій галузі, а в 2015 р. після аналізу даних FDA повідомив, що немає жодних підстав для заборони використовувати очищені препарати стевії в їжу. Останні представлені нині на харчовому ринку як добавки до продуктів, які продаються в США [37].

Харчові добавки, виготовлені зі стевії, дозволені для використання у багатьох країнах. Препарати із листків стевії широко застосовують для приготування десертів, морозива, вафель, жувальних гумок, соків, напоїв, соусів,

рибних паст, дієтичних продуктів. На відміну від штучних підсолоджувачів стевіозид не руйнується під час нагрівання, тому його використовують для приготування кондитерських виробів та гарячих напоїв. Традиційно стевію застосовують у вигляді подрібненого трав'яного порошку, настоянок, чаю. Порошок листків стевії додають у страви, напої, кондитерські вироби [29].

Стевія — багаторічна трав'яниста рослина, яка належить до порядку *Compositales*, родини *Asteraceae* [1].

Коренева система мичкувата. Стевія нестійка до низьких температур і за температури нижче за +12 °С майже не розвивається, чутлива до морозів, тому в умовах помірного клімату України її можна вирощувати в природних умовах як однорічну культуру, оскільки у зимовий період її кореневища зимують.

Основні солодкі складові стевії — тетрациклічні дитерпенові глікозиди стевіозид і ребаудіозид — виділено у 1931 р., а в 1950-х рр. встановлено їх хімічну будову. Вони походять від одного аглікону — стевіолу, речовини, позбавленої смаку, дитерпеноїду кауранової групи, близької до гіберелінів (хімічна назва — 13-гідрокси-16-каурен-19-карбонова кислота). Головним джерелом цих сполук, яких відомо понад два десятки, є листки [15, 35]. У листках середній вміст чотирьох основних компонентів, характерний для дикої (wild-type) стевії, становить (на суху масу): стевіозиду — 9,1 (4—13) %, ребаудіозиду А — 3,8 (2—4) %, ребаудіозиду С — 0,6 %, дулькозиду — 0,3 %. Стевія також продукує гідроксикоричні кислоти у вигляді кон'югатів з хінною та шикімовою кислотами [24, 26] і флавонолами, лабданові та норлабданові дитерпеноїди (стерєбіни А—М) тощо [15, 18—20, 35]. Крім того, стевія містить білки, мінерали (фосфор, залізо, натрій, магній, хром, кобальт, селен), таніни, вітаміни (аскорбінову кислоту, провітамін А, тіамін, рибофлавін), чинить антибактеріальну, антифунгіцидну та антиоксидантну дію [17, 19, 20]. Є дані щодо протиракової активності стевії [34].

Оскільки насіння стевії недостатньо визріває в умовах помірного клімату України, одним з основних завдань при інтродукції є вирощування її в польових умовах за однорічним циклом. У зв'язку з тим, що товарною частиною, заради якої її вирощують, є листки, всі агротехнічні прийоми мають бути спрямовані на досягнення оптимальної площі листової поверхні, при якій листки мали б найкращі можливості для фотосинтезу, а отже, і для біосинтезу дитерпенових глікозидів.

З огляду на те, що стевія — пропасна культура, попередниками її мають бути рослини вузькорядного або суцільного способу сівби — трави, зернові, зернобобові. Оптимальними для вирощування стевії є ґрунти з легким механічним складом, слабокислі, з високим рівнем ґрунтових вод [16, 17]. На важких ґрунтах, збагачених органічними речовинами, можуть розвиватися хвороби кореневої системи. Розсаду висаджують у відкритий ґрунт тоді, коли минає загроза заморозків, а середньодобова температура повітря досягає +10 °С [9].

Оскільки досліджено лише окремі питання технології вирощування у відкритому ґрунті та введення *Stevia rebaudiana* в культуру *in vitro* як зарубіжними [27, 31], так і вітчизняними науковцями [10], це не сприяло широкому впровадженню культури у виробництво.

Мета роботи — провести комплексні інтродукційні, селекційні та біотехнологічні дослідження рослин *Stevia rebaudiana* в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України, встановити біолого-морфологічні особливості, біохімічний склад, стійкість високопродуктивних скоростиглих форм рослин залежно від умов вирощування (відкритий ґрунт, захищений ґрунт, в культурі *in vitro*) за насінного та вегетативного розмноження.

Значну увагу приділено виявленню основних формоспецифічних ознак рослин *Stevia rebaudiana*. Важливим досягненням селекційної роботи був відбір найпродуктивніших скоростиглих форм, які здатні розмножуватися насінням в умовах відкритого ґрунту на півночі України, де раніше культивування *Stevia rebaudiana* було абсолютно неможливим.

Матеріал та методи

Для культивування *in vitro* рослини стевії з різними генотипами вирощували за температури повітря 24—26 °С, з фотоперіодом 16 год та освітленням 2,0—2,5 клк на модифікованому середовищі Мурасіге—Скуга [32]. Це середовище містить 0,5 дози макро- і мікроелементів з додаванням 30 г/л сахарози і 7,45 г/л агару та має слабокислу реакцію (рН 5,6—6,0).

Визначали вміст дитерпеноїдних глікозидів та фенольних сполук *in vivo* (листки апікальної і базальної частини стебла) та *in vitro* (калуси і листки обкорінених пагонів). Для аналізу вмісту терпенових глікозидів у листках стевії використовували високоефективну рідинну хроматографію на автоматичному 4-канальному рідинному хроматографі Agilent 1100 з діодно-матричним детектором та хімічною станцією (Agilent Technologies, Німеччина). Зразки отримували з листових пластин дорослих рослин стевії. Грубо подрібнений повітряно-сухий матеріал екстрагували метанолом у співвідношенні 100 мг на 2 мл відповідно. Хроматографічне розділення екстрактів, які містили досліджувані речовини, проводили в градієнті вода—ацетонітрил на колонці Zorbax ODS 4,6 × 250 мм, 5 мкм. Результати обробляли та представляли за допомогою програмного забезпечення Agilent Chem Station® і Corel Draw®.

Кількісний вміст флаваноїдів визначали за методикою, розробленою співробітниками Санкт-Петербурзької державної хіміко-фармацевтичної академії. Аналіз рослинної сировини на вміст аскорбінової кислоти проводили за В.П. Крищенком (1983) [5] і Б.П. Плешковим (1985) [7]. Посухостійкість визначали за методикою Л.Г. Добренькової (1989) [2].

Результати та обговорення

У Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України проводяться інтродукційні, селекційні та біотехнологічні дослідження *S. rebaudiana*. Створено понад 20 форм, які відрізняються за морфолого-біологічними особливостями, біохімічним складом і продуктивним потенціалом. Із застосуванням селекційних



Рис. 1. Галуження рослин *Stevia rebaudiana*: 1 — слабке (до 10 пагонів); 2 — помірне (10—18); 3 — сильне (понад 18 пагонів)

Fig. 1. Branching of *Stevia rebaudiana* plants: 1 — poor (10 stems); 2 — moderate (10—18); 3 — strong (over 18 stems)

методів створено ранньо-, середньо- та пізньостиглі форми рослин, які здатні забезпечити насіннєве розмноження в умовах півночі України у відкритому ґрунті. Розроблено методику проведення експертизи сортів *Stevia rebaudiana* на відмінність, однорідність та стабільність [6].

За морфологічними ознаками рослини *S. rebaudiana* суттєво відрізняються. Дослідження створених форм рослин дало змогу охарактеризувати та згрупувати їх за різними показниками. За висотою виділено три групи рослин: низькі (до 45 см), середні (46—70 см) і високі (понад 71 см). За габітусом рослини можуть бути прямі, напіврозлогі, розлогі. Форма куща може бути овальною, кулястою, розлогою, пірамідальною, циліндричною, конусоподібною. Виявлено різноманітні за ступенем галуження, облиствленості, а також характером опушення рослини. Стебло та листя рослин зеленого кольору (від світлого до темного відтінка), також трапляються рослини з антоціановим забарвленням. Листки яйцеподібною, еліптичною, обернено-ланцетною або ланцетною форми. За довжиною виділено короткі (до 4,0 см), середні (4,1—6,0 см), довгі (понад 6,1 см) листки, за шириною — вузькі (до 1,5 см), середні (1,6—2,1 см), широкі (понад 2,2 см) листки. Край листової пластинки зубчастий або цілісний (рис. 1 та 2).

Квітки зібрані в кошики (по 5 квіток у кожному), які формують складне суцвіття — щиток. Суцвіття також характеризується варіабельністю параметрів: за довжиною — коротке (до 2,0 см), середнє (2,1—8,0 см), довге (понад 8,1 см), за формою — головчасте, циліндричне, видовжено-циліндричне, за кількістю квіток — малокуткове (до 6 шт.), середньоквіткове (7—12 шт.), багатоквіткове (понад 13 шт.). Квітки стевиї дуже дрібні двостатеві, актиноморфні, п'ятичленні. Віночок зрослопелюстковий, трубчастий, має форму видовженого дзвоника, забарвлення від білого, сіривато-білого до зеленувато-білого. Квітка за розміром може бути малою (до 2 мм), середньою (3—4 мм) та великою (понад 5 мм).

За часом початку цвітіння рослини розподілено на ранні (до 105 діб від початку вегетації до цвітіння), середні (105—125 діб) та пізні (понад 125 діб) форми.

Насіння дрібне, варіює за довжиною (коротке, середнє, довге). Маса 1000 шт. насіння мала (до 0,29 г), середня (0,30—0,40 г) та велика (понад 0,41 г). Забарвлення різної інтенсивності від сірого до коричневого. Рослини відрізняються також за характером та інтенсивністю проходження фізіологічних процесів і ступенем накопичення біологічно активних речовин, зокрема глікозидів, вміст яких може бути низьким (до 8 %), середнім (8—14 %) та високим (понад 14 %).

Оскільки рослинам стевиї незалежно від форми притаманне дрібне насіння, це унеможливує сівбу насіння безпосередньо у відкритий ґрунт за допомогою технічних засобів. Важливим та ефективним методом є висадка в ґрунт розсади, вирощеної із насіння в захищеному ґрунті. Сівбу проводять у I-II декаді квітня. Рослини у цих умовах перебувають до фази сходів та появи 1—3 справжніх листків. Висаджувати рослини у відкритий ґрунт рекомендується не раніше III декади травня, коли міняє загроза нічних заморозків та зберігається достатня кількість вологи у ґрунті. Рослини стевиї у відкритому ґрунті проходять такі фази розвитку: стеблуння, бутонізації, цвітіння, плодоношення, досягання насіння.



Рис. 2. Листкова пластинка *Stevia rebaudiana*: форма (1 — яйцеподібна; 2 — еліптична; 3 — обернено-ланцетна; 4 — ланцетна); зубчастість краю (1 — відсутня; 2 — наявна)

Fig. 2. Leaf plate of *Stevia rebaudiana*: the shape (1 — ovate; 2 — elliptical; 3 — oblanceolate; 4 — lanceolate); serration of edge (1 — absent; 2 — present)

У зв'язку із складністю отримання повноцінного насіння у великій кількості, а також через майже повну втрату його схожості під час тривалого зберігання, високу вартість процесу збору урожаю розмноження стевії *in vitro* є актуальним та високоефективним. Застосування цього методу значно збільшує коефіцієнт розмноження порівняно зі звичайним живцюванням, дає змогу отримувати незалежно від пори року та погодних умов позбавлений від хвороб та грибової інфекції посадковий матеріал зі збереженням його генетичної однорідності та стабільності. Тривають пошуки ефективних методів передпосівної обробки насіння.

Ми ввели в культуру *in vitro* 12 форм стевії. Вперше опрацьовано технологію отримання регенерантів з листових експлантів [8]. Цей метод дав змогу значно прискорити розмноження стевії і за короткий період отримати велику кількість рослинного матеріалу.

Первинним матеріалом для отримання стерильних (чистих від мікроорганізмів) рослин стевії *in vitro* було насіння. Його обробляли 70 % спиртом з експозицією 30 с, а потім 0,5 % розчином тимерозалу ($C_9H_9HgNaO_2S$) з експозицією 5 хв. Стерилізоване насіння переносили на поживне середовище і пророщували за температури 26 °С.

Тривалість періоду до появи проростків стевії становила від 14 до 20 діб. Живцювання

рослин проводили за наявності на рослинах 3—5 міжвузлів. Частину стебла (мікроживець) завдовжки 1,0—1,5 см з двома пазушними бруньками базальною частиною вертикально розміщували в агаризованому поживному середовищі на глибину 0,3—0,5 см. Процес посадки мікроживців можна повторювати багаторазово, збільшуючи кількість пагонів з одного експланту.

Для регенерації рослин з листових експлантів листки сформованих рослин зрізали і переносили на модифіковане середовище Мурасіге—Скуга, яке містить 0,5 дози макро- і мікроелементів з додаванням 200 мг/л мезоінозиту, 30 г/л сахарози, 7,45 г/л агару (рН 5,6—6,0) і регуляторів росту (нафтилоцтової кислоти, 6-бензиламінопурину, індол-3-оцтової кислоти, тидіазурону, кінетину) у поєднанні з вітамінами (B_1 , B_6) та залізом.

Початкові етапи регенерації відбувалися за температури +26—28 °С у темноті. Одержані мікропагони субкультивували на середовищі Мурасіге—Скуга при освітленні люмінесцентними лампами (2,0—2,5 клк) з 16-годинним фотоперіодом за температури +26 °С і вологості 70 %.

Установлено, що найбільш виражений стимулювальний вплив на процес регенерації забезпечує середовище з додаванням 0,2 мг/л тидіазурону у поєднанні з вітамінами B_1 , B_6 та заліза у дозі 52 мг/л.

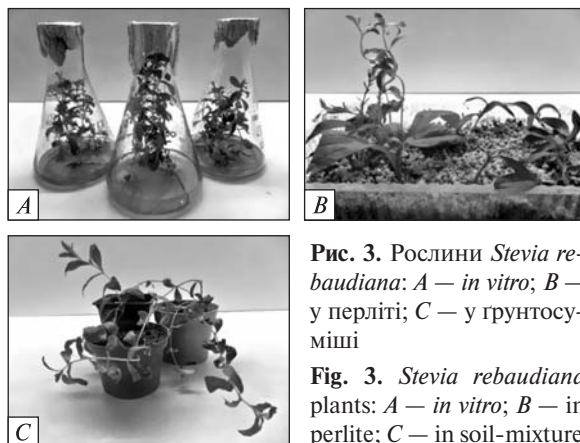


Рис. 3. Рослини *Stevia rebaudiana*: А — *in vitro*; В — у перліті; С — у ґрунтосуміші

Fig. 3. *Stevia rebaudiana* plants: А — *in vitro*; В — in perlite; С — in soil-mixture

Початок формування пагонів із експлантів у рослин з різними генотипами спостерігали на 20–50-ту добу. Відзначено фенотипічний ефект індукції регенерантів. Виділено генотипи із здатністю до стабільної регенерації пагонів. Проведено скринінг регенерантів за здатністю до вторинної регенерації рослин із листових експлантів. Відібрано регенеранти, здатні індукувати утворення пагонів на 10-ту добу з частотою 2–3 регенеранти на експлант, тоді як частота первинної регенерації становила 0,25–1,00 регенерант на експлант.

Сформовані рослини-регенеранти ділили на сегменти довжиною 1,0–1,5 см з двома пазушними бруньками і розміщували вертикально на агаризованому середовищі. Після формування кореневої системи рослини перенесли на спеціально підготовлений стерильний субстрат, де відбувалася адаптація рослин до умов *in vivo*. Опрацьовано процес мікроклонального розмноження та переведення стевії із культури *in vitro* у відкритий ґрунт (рис. 3).

Відомо, що для підтримання колекції необхідно пересаджувати рослини кожні 2–3 тиж, що, крім матеріальних витрат, збільшує ризик контамінації середовища та втрати колекційного матеріалу [22, 26]. Ми розробили поживні середовища, які містили інгредієнти, котрі сповільнюють ріст рослин. Визначено умови культивування, які забезпечують тривале зберігання рослин стевії в умовах *in vitro*. Так, використання різних концентрацій мікро- та макроелементів показало, що сповільнити ріст рослин можна, застосовуючи низькі концентрації елементів, збільшуючи щільність поживного середовища та зменшуючи інтенсивність освітлення [12, 13].

За результатами біохімічних аналізів установлено, що найбільший вміст флавоноїдів (0,91 мг%) накопичується у листках рослин, вирощених в умовах відкритого ґрунту, середній вміст (0,60 мг%) — у листках рослин, вирощених в умовах *in vitro*, найнижчий (0,15 мг%) — у калусних тканинах. За вмістом аскорбінової кислоти найбільший показник (260,05 мг%) виявлено у листках рослин, вирощених в умовах *in vitro*, середній (258,09 мг%) — у листках рослин, вирощених у відкритому ґрунті, найменший (67,58 мг%) — у калусі. Для калусних тканин *S. rebaudiana* характерна загальна тенденція до накопичення низького рівня як флавоноїдів, так і аскорбінової кислоти (табл. 1).

Аналогічні закономірності продукування дитерпенових глікозидів та гідроксикоричних кислот у рослин стевії, вирощених в умовах *in vitro* (листки колекційних рослин) та *in vivo* (калуси і вкорінені пагони), добре помітні на типових хроматографічних профілях (рис. 4).

Таблиця 1. Вміст флавоноїдів та аскорбінової кислоти (мг%) у калусі та листках *Stevia rebaudiana* залежно від умов культивування

Table 1. The content of flavonoids and ascorbic acid (mg%) in callus and leaves of *Stevia rebaudiana* depending on cultivation conditions

Рослинний матеріал	Флавоноїди	Аскорбінова кислота
Калус	0,15	67,6
Листки, <i>in vitro</i>	0,60	260,1
Листки, відкритий ґрунт	0,91	258,1

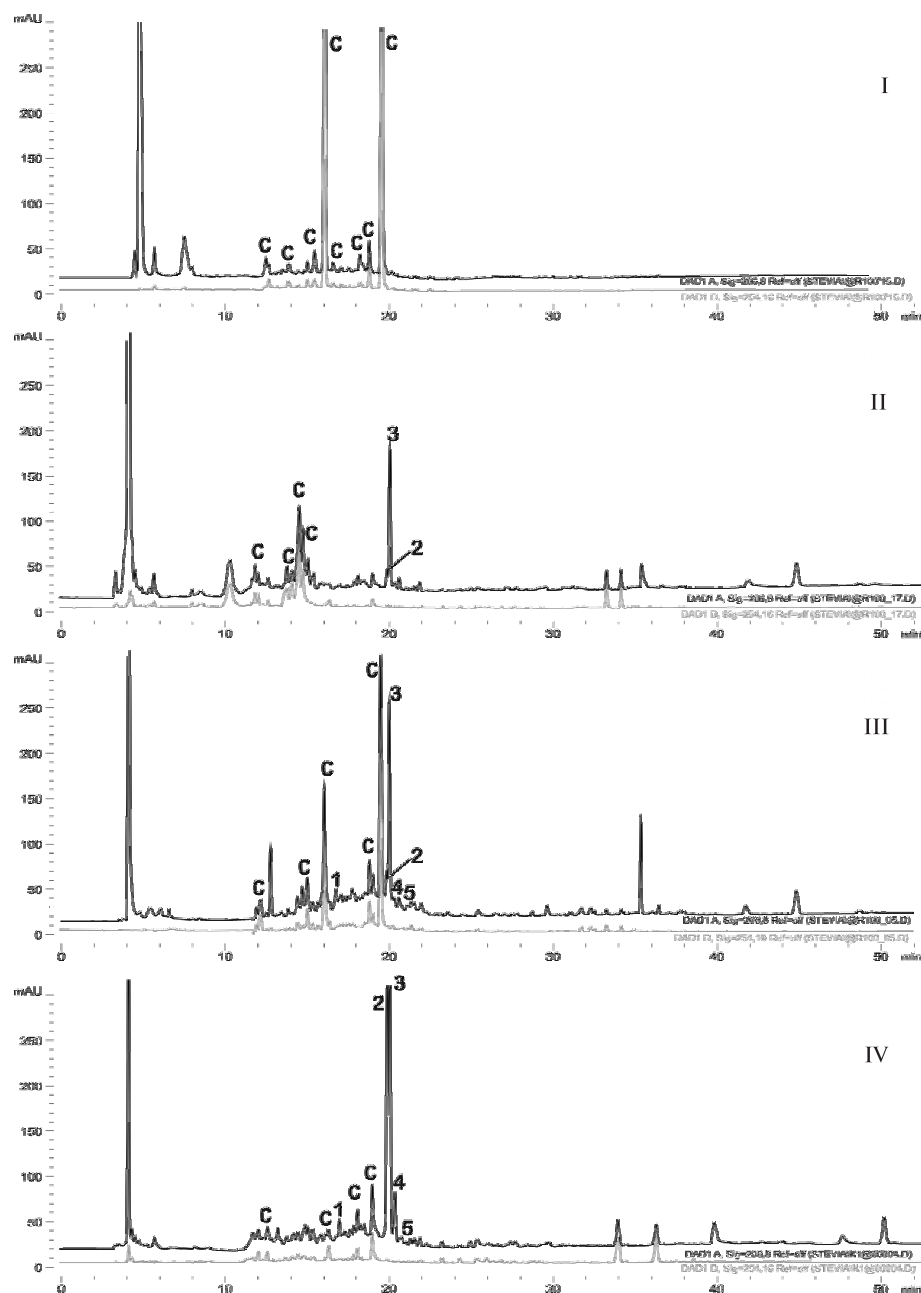


Рис. 4. Хроматограми екстрактів *Stevia rebaudiana* в режимі аналізу дитерпенових глікозидів: I — калус; II — листки обкорінених *in vitro* пагонів; III — листки апікальної частини рослин *in vivo*; IV — листки базальної частини рослин *in vivo*; 1 — ребаудіозид D; 2 — ребаудіозид A; 3 — стевіозид; 4 — ребаудіозид C; 5 — суміш дульткозиду A, ребаудіозиду D тощо; C — похідні гідроксикоричних кислот (кавової та ін.) — цинамати. Співвіднесення піків на основі стандартних речовин (ребаудіозид A, стевіозид), УФ-спектрів [19]

Fig. 4. The chromatograms of *Stevia rebaudiana* extracts in diterpene glycosides analysis mode: I — calluses; II — leaves of *in vitro* rooted shoots; III — apical leaves of plants *in vivo*; IV — basal leaves of plants *in vivo*; 1 — rebaudioside D; 2 — rebaudioside A; 3 — stevioside; 4 — rebaudioside C; 5 — mixture dulcoside A, rebaudioside D etc.; C — hydroxycinnamic acid derivatives (caffeic and others) — cinnamics. Peaks matching is based on standard substances (rebaudioside A, stevioside), UV spectra [19]

Таблиця 2. Водотримувальна здатність листків рослин *Stevia rebaudiana* для встановлення відносної посухостійкостіTable 2. Water retentivity of *Stevia rebaudiana* leaves to set there lative drought tolerance

Форма та умови культивування	Водотримувальна здатність, втрата води					
	Експозиція, год					
	2	4	6	24	Середня за 1 год	Оцінка посухостійкості
R100 <i>in vivo</i>	15,5 ± 0,7	24,2 ± 1,4	30,5 ± 2,0	61,0 ± 2,14	2,54 ± 0,09	Низька
R100 <i>in vitro</i>	82,8 ± 0,9	84,3 ± 0,9	78,5 ± 1,0	81,6 ± 0,86	3,40 ± 0,04	"
3Т <i>in vivo</i>	25,9 ± 1,9	37,2 ± 2,4	44,3 ± 2,2	69,9 ± 0,81	2,91 ± 0,03	"
3Т <i>in vitro</i>	70,2 ± 1,8	82,5 ± 0,3	84,8 ± 0,3	87,7 ± 0,20	3,65 ± 0,01	"
St5 <i>in vivo</i>	16,6 ± 0,4	25,8 ± 0,1	32,3 ± 0,1	62,3 ± 0,1	2,60 ± 0,01	"
St5 <i>in vitro</i>	75,5 ± 1,5	86,4 ± 0,4	84,5 ± 0,6	87,3 ± 0,5	3,64 ± 0,02	"

У листках базальної частини колекційних рослин *Stevia rebaudiana* вміст стевіол-глікозидів становив 3—9 %, зокрема ребаудіозиду А — до 4,5 % на абс. суху масу, або 60 % від суми стевіол-глікозидів. Калусні тканини, утворені на стандартних середовищах, не містять стевіол-глікозидів. У них виявлено велику кількість депсидів гідроксикоричних кислот та інші фенольні сполуки. Зрозуміло, що в стані калусу без модифікації середовищ у рослин не відбувається біогенез терпеноїдів, а вторинний метаболізм спрямований на синтез фенілпропаноїдів. Під час онтогенезу, коли відбувається диференціювання тканин рослини на вегетативні та генеративні органи, фенольний метаболізм у листках поступово змінюється на терпеноїдний з повноцінним синтезом стевіол-глікозидів, вміст яких визначається як генотипом, так і умовами вирощування.

Установлено, що у листках стевії накопичується в середньому близько 6-7 % (від абс. сухої маси) глікозидів, але цей показник може варіювати залежно від умов вирощування та форми стевії. Найбільший вміст стевіозидів виявлено у рослин відкритого ґрунту у фазу бутонізації.

За результатами досліджень посухостійкості рослин залежно від умов зростання встановлено, що ґрунтові рослини *S. rebaudiana* незалежно від форми під час посухи втрачають вологу поступово і в цілому на 20—25 %

менше, ніж рослини, які зростають на агаризованому середовищі (табл. 2).

Форми *S. rebaudiana* 3Т та *S. rebaudiana* St5 втрачають основний об'єм, а форма R100 — увесь об'єм вологи протягом перших 2 год. Рослини, які зростають у ґрунтових умовах, відрізняються вищою водотримувальною здатністю, а отже, і вищою посухостійкістю порівняно із рослинами, котрі зростають в умовах *in vitro*. Із досліджених форм найбільшу водотримувальну здатність, як у ґрунтових умовах, так і в умовах *in vitro*, встановлено у формі R100, найменшу — у формі 3Т.

За шкалою оцінки параметрів водного режиму листків та визначення відносної посухостійкості рослин (розробленою науковцями Павлівської дослідної станції Всесоюзного інституту рослинництва) рослини *S. rebaudiana* в посушливих умовах незалежно від форми та умов зростання втрачають після в'янення $\geq 50,1$ % вологи, що свідчить про їх низьку посухостійкість, а тому потребують систематичного поливу.

Висновки

Аналіз літератури свідчить, що рослини *Stevia rebaudiana* характеризуються цінними лікарськими та харчовими властивостями і є перспективними інтродуцентами в Україні. В Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка створено цінний генофонд, який нараховує понад 20 форм. Розроблено ефективний біо-

технологічний метод введення рослин у культуру *in vitro*. Визначено кількісний та якісний вміст флавоноїдів та аскорбінової кислоти у фітосировині стевії.

Для масового розмноження *Stevia rebaudiana* доцільно використовувати безгормональне середовище Мурасіге—Скуга. Зменшення концентрації мінеральних речовин у поживному середовищі вдвічі не позначається на інтенсивності росту і розвитку рослин. Для регенерації рослин з листових експлантів оптимальним є середовище Мурасіге—Скуга з додаванням 0,2 мг/л тидіазурону у поєднанні з вітамінами В₁, В₆ та заліза у дозі 52 мг/л. Інтеграція всіх умов гальмування росту рослин *Stevia* дала змогу депонувати рослини в культурі *in vitro* понад 6 міс.

Установлено, що у листках *Stevia rebaudiana* накопичується в середньому близько 6—7 % (від абс. сухої маси) глікозидів. Це динамічний показник, який залежить від форми та умов культивування. Максимальне накопичення стевіозидів спостерігається у рослин відкритого ґрунту у фазу бутонізації.

Рослини *Stevia rebaudiana* незалежно від форми та умов культивування (відкритий та захищений ґрунт, *in vitro*) характеризуються низьким рівнем посухостійкості. Рослини, які зростають у ґрунтових умовах, відрізняються вищою посухостійкістю порівняно із рослинами, які зростають в умовах *in vitro*. Найбільшу водоутримувальну здатність, як у ґрунтових умовах, так і в умовах *in vitro*, встановлено у форми R100, найменшу — у форми ЗТ.

1. Гулько Р. Словник лікарських рослин світової медицини латинською і шістьма слов'янськими мовами. Латинсько-українсько-російсько-болгарсько-словацько-польсько-чеський / Р. Гулько. — Львів: Ліга-Прес, 2007. — 443 с.
2. Добренькова Л.Г. Засухоустойчивость сортов земляники ананасной в условиях северо-запада РСФСР и Краснодарского края / Л.Г. Добренькова // Каталог мировой коллекции ВИР. — 1989. — Вып. 502. — 20 с.
3. Завгородній В.М. Оптимізація елементів технології вирощування стевії в умовах Лісостепу України: Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: 06.01.09 / В.М. Завгородній ; Ін-т цукр. буряків УААН. — К., 2006. — 20 с.

4. Интернет-ресурс: [http://www.medn.ru/statyi/lekarstvennyie-rasteniya/steviya-stevia-rebaudiana-bertoni.html]
5. Крищенко В.П. Методы оценки качества растительной продукции / В.П. Крищенко. — М.: Колос, 1983. — 192 с.
6. Методика проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (ВОСТЕСТ). Лікарські та ефіроолійні / За наук. ред. С.О. Ткачик. — К.: Нілан-ЛТД, 2014. — 852 с.
7. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений / Б.П. Плешков. — М.: Колос, 1968. — 184 с.
8. Прямая регенерация растений из листовых эксплантов *Stevia rebaudiana* / Л. М. Шпак, А.В. Любинская, Д.Б. Рахметов, Б.А. Левенко // Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках: Матеріали Міжнар. наук. конф., присвяченої 75-річчю заснування НБС ім. М.М. Гришка НАН України (15—17 вересня 2010 р.). — К.: Фітосоціоцентр, 2010. — С. 630—632.
9. Роговский С.В. Размножение стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) черенками и особенности выращивания в условиях Правобережной Лесостепи Украины: Автореф. дис. на соискание науч. степени канд. с.-х. наук 06.01.09 / С.В. Роговский; Ин-т сахарной свеклы УААН. — К., 1992. — 25 с.
10. Стефанюк В.Й. Стевия в Україні. / В.Й. Стефанюк. — 2-е вид., доп. — К.: Труд-ГринПол, 2009. — 128 с.
11. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: Метод. указания к лабораторным занятиям. — СПб.: Гос. хим.-фарм. акад., 1996.
12. Шпак Л.М. Длительное хранение стевии в культуре *in vitro* / Л.М. Шпак, Д.Б. Рахметов, Б.А. Левенко // Дендрологія, квітникарство та садово-паркове будівництво: Матеріали Міжнар. наук. конф., присвяченої 200-річчю Нікітського ботанічного саду (5—8 червня 2012 р., Ялта). — Ялта, 2012.
13. Шпак Л.М. Длительное хранение *Stevia rebaudiana* Bert. в культуре *in vitro* / Л.М. Шпак, Д.Б. Рахметов, Б.А. Левенко // Проблеми експериментальної ботаніки та біотехнології. — К.: Фітосоціоцентр, 2012. — 240 с.
14. A review on natural sweetener plant — *Stevia* having medicinal and commercial importance / B. Ahmed, M. Hossain, R. Islam et al. // Agronomski Glasnik. — 2011. — N 1-2. — P. 75—91.
15. Bondarev N. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni / N. Bondarev, O.V. Reshetnyak, A.M. Nosov // Plant Science. — 2001. — Vol. 161. — P. 155—163.
16. Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides / Y. Tamura, S. Nakamura, H. Fukui, M. Tabata // Plant Cell Rep. — 1984. — N 3. — P. 180—182.

17. *Cultivation and utilization of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) / A.G. Lyakhovkin, T.D. Long, D.A. Titov, M.P. Anh. — Hanoi, Agricultural Publishing House, 1993. — P. 1—44.*
18. *Dictionary of Natural Products, ver.24.2. CRC Press., Taylor & Francis Group, 2016. — Moda access: <http://dnp.chemnetbase.com>).*
19. *Esmat Abou-Arab A. Evaluation of bioactive compounds of Stevia rebaudiana leaves and callus / A. Esmat Abou-Arab, M. Ferial Abu-Salem // Afr. J. Food Science. — 2010 — Vol. 4(10). — P. 627—634.*
20. *Esmat Abou-Arab A. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana Bertoni plant / A. Esmat Abou-Arab, A. Azza Abou-Arab, M. Ferial Abu-Salem // Afr. J. Food Science. — 2010. — Vol. 4(5). — P. 269—281.*
21. *Fastandisocratic HPLC method for steviolglycosides analysis from Stevia rebaudiana leaves / D. Bergs, B. Burghoff, M. Joehnck et al. // J. Verbr. Lebensm. — 2012. — N 7. — P. 147—154.*
22. *Ferreira C.M. Micropropagation of Stevia rebaudiana through leaf explants from adult plants / C.M. Ferreira, W. Handro // Planta Medica. — 1988. — Vol. 54. — P. 157—160.*
23. *Glycosides from Stevia rebaudiana / G.I. Kovylyayeva, G.A. Bakaleinik, I.Yu. Strobkyina et al. // Chemistry of Natural Compounds. — 2007. — Vol. 43. — P. 81—85.*
24. *Harmanjit Kaur Chromatographic determination of stevioside in leaf parts of in vitro and in vivo regenerated plants of Stevia rebaudiana / Kaur Harmanjit // Inter. J. Natural Products Research. — 2011. — N 1 (4). — P. 44—48.*
25. *HPLC determination of stevioside in plant material and food samples / L. Bovanova, E. Brandsteterova, S. Boxa et al. // Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A. Food and Research Technology. — 1998. — Bd. 207. — S. 352—355.*
26. *Ilenko I. Microclonal propagation of stevia in vitro culture / I. Ilenko // Introduction into culture of Stevia — a source of low caloric substitute of sugar. — K.: ВНИС, 1990. — С. 74—79.*
27. *In vitro propagation of Stevia rebaudiana Bert in Bangladesh / M.S. Uddin, M.S. Chowdhary, M.M. Khan et al. // Afr. J. Biotechnol. — 2006. — N 5. — P. 1238—1240.*
28. *Karaköse H., Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in Stevia rebaudiana leaves by LC-MSn / H. Karaköse, R. Jaiswal, N. Kuhnert // J. Agric. Food Chem. — 2011. — Vol. 59 (18). — P. 10143—10150.*
29. *Kinghorn A.D. Stevia: The Genus Stevia (Medicinal and Aromatic Plants — Industrial Profiles) / A.D. Kinghorn. — London and New York: Taylor & Francis, 2002. — 224 p.*
30. *Lindley J. The Treasury of Botany: a popular dictionary of the vegetable kingdom, with which is incorporated a glossary of botanical terms / J. Lindley, T. Moore. — London: Longmans, Green, and Co, 1866. — 648 p.*
31. *Micropropagation of Stevia rebaudiana bertoni through temporary immersion bioreactor system / N. Noordin, I. Rusli, N. Hidayah Sajahan et al. // Research and Development Seminar. Bangi (Malaysia); 26—28 Sep 2012. — 2012. — 8 p.*
32. *Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, P.A. Skoog // Physiol. Plant. — 1963. — Vol. 15. — P. 473—479.*
33. *Sivaram L. In vitro culture studies of Stevia rebaudiana / L. Sivaram, U. Mukundan // In vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 2003. — Vol. 39. — P. 520—523.*
34. *Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: A Review / S. Madan, S. Ahmad, S.N. Singh et al. // I. Ind. J. Natural Products and Resources. — 2010. — Vol. 1(3). — P. 267—286.*
35. *Steviol glycoside content in different organs of Stevia rebaudiana and its dynamics during ontogeny / N. Bondarev, M.A. Sukhanova, O.V. Reshetnyak, A.M. Nosov // Biologia Plantarum. — 2003. — Vol. 47. — P. 261—264.*
36. *The practical application of Stevia research and development data / O. Katayama, T. Sumida, H. Hayashi, H. Mitsuhashi // I S U Company Japan, 1976. — 747 p.*
37. *URL: <http://www.medn.ru/statyi/lekarstvennyie-rasteniya/steviya-stevia-rebaudiana-bertoni.html>*
38. *U.S. Food and Drug Administration (FDA) website. — Moda access: <http://www.fda.gov>.*

REFERENCES

1. *Hulko, R. (2007), Slovník lékařských rostlin světové medicíny latynskými i šesti slovanskými jazyky. Latynsko-ukrajinsko-rosijsko-bolharsko-slovácko-polsko-český [The world medical dictionary of medicinal plants in Latin and six Slavic languages. Latin-Ukrainian-Russian-Bulgarian-Slovak-Polish-Czech]. Lviv, Liha-Pres, 443 p.*
2. *Dobrenkova, L.H. (1989), Zasukhoustoichyivost sortov zemlianyky ananasnoi v uslovyakh severo-zapada RSFSR i Krasnodarskoj kraia [Drought resistance of the pineapple strawberry in the conditions of northwest of RSFSR and Krasnodarsk region]. Lviv: Katalog myrovoi kolektsyy VYR, vyp. 502, 20 p.*
3. *Zavhorodnij, V.M. (2006), Optymizatsiia elementiv tekhnolohii vyroshchuvannia stevii v umovakh Lisostepu Ukrainy [Partial optimization of the Stevia cultivation technology in the conditions of Ukrainian Forest-Steppe]: Avtoref. dys... kand. s.-h. nauk: 06.01.09. In-t tsukr. buriakiv UAAN. K., 20 p.*
4. *<http://www.medn.ru/statyi/lekarstvennyie-rasteniya/steviya-stevia-rebaudiana-bertoni.html>*

5. Kryshchenko, V.P. (1983), Metody otsenki kachestva rastytelnoi produktsii [The methods of vegetable production quality assessment]. Moskva, Kolos, 192 p.
6. Metodyka provedennia ekspertyzy sortiv roslyn na vidminnist, odnoridnist ta stabilnist (VOS-TEST). Likarski ta efirooliini, (2014). [Evaluation procedure of different cultivars on diversity, homogeny and stability] Za nauk. red. S.O. Tkachyk. Kyiv, Nilan Ltd, 852 p.
7. Pleshkov, B.P. (1968), Praktikum po byokhymy rastenyi [Phytochemistry practicum]. Moskva, Kolos, 184 p.
8. Shpak, L.M., Liubynskaia, A.V., Rakhmetov, D.B. and Levenko, B.A. (2010), Priamaia regeneratsiia rastenii iz listovykh eksplantov *Stevia rebaudiana* [Direct regeneration of plants from leaf explants of *Stevia rebaudiana*] Introduksiia roslyn, zberezhennia ta zbahachennia bioriznomanittia v botanichnykh sadakh i dendroparkakh: Materialy Mizhnarodnoi naukovoï konferentsii prysviachenoï 75-richchiu zasnuvannia NBS im. M.M. Hryshka NAN Ukrainy, 15–17 veresnia 2010 r. K.: Fitosotsiotsentr, pp. 630–632.
9. Rohovskyi, S.V. (1992), Razmnozhenie stevii (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cherenkami i osobennosti vyrashchivaniia v usloviakh Pravoberezhnoi Lesostepi Ukrainy [Propagation by cuttings of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and peculiarities of its cultivation in conditions of Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine]. Avtoref. dys...kand. s.-kh. nauk 06.01.09. In-t sakh. svely UAAN. Kyiv, 25 p.
10. Stefaniuk, V.Y. (2009), Stevia v Ukraini [Stevia in Ukraine]. 2-e vyd., dop. Kyiv, Trud-HrynPol, 128 p.
11. Fitokhimicheskii analiz lekarstvennogo rastitelnogo syria. Metodicheskie ukazaniia k laboratornym zaniatiyam, (1996), [Photochemical analysis of herbal medicinal plants. Methodical guidance to the laboratory practicum]. Sankt-Peterburh, S.-P. hos. khym.-farm. akad.
12. Shpak, L.M., Rakhmetov, D.B. and Levenko, B.A. (2012), Dlitelnoe khranenie stevii v kulture in vitro [Long term storage of stevia in *in vitro* culture]. Dendrolohiia, kvitnykarstvo ta sadovo-parkove budivnytstvo: Materialy Mizhnarodnoi naukovoï konferentsii, prysviachenoï 200-richchiu Nikitskoho botanichnogo sadu (5–8 chervnia 2012 r., Yalta). Yalta, p. 177.
13. Shpak, L.M., Rakhmetov, D.B. and Levenko, B.A. (2012), Dlitelnoe khraneniye *Stevia rebaudiana* Bert. v kulture in vitro [Long term storage of *Stevia rebaudiana* Bert. in *in vitro* culture]. Problemy eksperimentalnoi botaniky ta biotekhnologii [Problems of experimental botany and biotechnology]. Kyiv: Fitosotsiotsentr, 240 p.
14. Ahmed, B., Hossain, M., Islam, R. et al. (2011), A review on natural sweetener plant — *Stevia* having medicinal and commercial importance. Agronomski Glasnik, N 1, 2, pp. 75–91.
15. Bondarev, N., Reshetnyak, O.V. and Nosov, A.M. (2001), Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Science, vol. 161, pp. 155–163.
16. Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H., and Tabata, M. (1984), Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides. Plant Cell Rep., N 3, pp. 180–182.
17. Lyakhovkin, A.G., Long, T.D., Titov D.A., and Anh, M.P. (1993), Cultivation and utilization of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Hanoi, Agricultural Publishing House, pp 1–44.
18. Dictionary of Natural Products, ver.24.2. CRC Press., Taylor & Francis Group, 2016 (Moda access: <http://dnp.chemnetbase.com>).
19. Esmat Abou-Arab, A. and Ferial Abu-Salem, M. (2010), Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Afr. J. Food Science, vol. 4(10), pp. 627–634.
20. Esmat Abou-Arab, A., Abou-Arab, A. and Ferial Abu-Salem, M. (2010), Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertoni plant. Afr. J. Food Science, vol. 4(5), pp. 269 – 281.
21. Bergs, D., Burghoff, B., Joehnck, M., Martin, G. and Schembecker, G. (2012), Fastandisocratic HPLC method for steviolglycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. J. Verbr. Lebensm., N 7, pp.147–154.
22. Ferreira, C.M. and Handro, W. (1988), Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. Planta Medica, vol. 54, pp. 157–160.
23. Kovylyayeva, G.I., Bakaleinik, G.A., Strobykina, I.Yu., Gubskaya, V.I., Sharipova, R.R., Al'fonsov, V.A., Kataev, V.E. and Tolstikov, A.G. (2007), Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 43, pp. 81–85.
24. Harmanjit, Kaur (2011), Chromatographic determination of stevioside in leaf parts of *in vitro* and *in vivo* regenerated plants of *Stevia rebaudiana*. Int. J. Natural Products Research, N 1 (4), pp. 44–48.
25. Bovanova, L., Brandsteterova, E. and Boxa, S. (1998), HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A. Food and Research Technology. A, vol. 207 (5), pp. 352–355.
26. Ilenko, I. (1990), Microclonal propagation of *Stevia in vitro* culture. VHIS. Introduction into culture of stevia — a source of low caloric substitute of sugar. Kyiv: VNIS, pp. 74–79.
27. Uddin, M.S., Chowdhary, M.S., Khan, M.M., Uddin, M.B., Ahmed, R. and Betan, M.A. (2006), *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. Afr. J. Biotechnology, N 5, pp. 1238–1240.

28. Karaköse, H., Jaiswal, R. and Kuhnert, N. (2011), Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MSn. J. Agric. Food Chem., vol. 59 (18), pp. 10143–10150.
29. Kinghorn, A.D. (2002), *Stevia: The Genus Stevia* (Medicinal and Aromatic Plants — Industrial Profiles), London and New York: Taylor & Francis, 224 p.
30. Lindley, J., and Moore, T. (1866), *The Treasury of Botany: a popular dictionary of the vegetable kingdom, with which is incorporated a glossary of botanical terms*. London, Longmans, Green, and Co, 648 p.
31. Noordin, N., Rusli, I., Hidayah Sajahan, N., Mohd Nahar, S.M. and Mohd Nahar, S.H. (2012), Micropropagation of *Stevia rebaudiana* bertonii through temporary immersion bioreactor system. Research and Development Seminar, Bangi (Malaysia), 26–28 Sep., 2012, 8 p.
32. Murashige, T. and Skoog, P.A. (1963), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, vol. 15, pp. 473–479.
33. Sivaram, L. and Mukundan, U. (2003), *In vitro* culture studies of *Stevia Rebaudiana*. *In vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*, vol. 39, pp. 520–523.
34. Madan, S., Ahmad, S., Singh, S.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., and Carg, M. (2010), *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii. — A Review. *Ind. J. Natural Products and Resources*, vol. 1(3), pp. 267–286.
35. Bondarev, N.I., Sukhanova, M.A., Reshetnyak, O.V. and Nosov A.M. (2003), Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum*, vol. 47, pp. 261–264.
36. Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H. and Mitsuhashi, H. (1976), The practical application of stevia research and development data I S U Company Japan, pp. 747.
37. URL: <http://www.medn.ru/statyi/lekarstvennyie-rasteniya/steviya-stevia-rebaudiana-bertonii.html>
38. U.S. Food and Drug Administration (FDA) website. Moda access: <http://www.fda.gov>.

Рекомендував до друку П.А. Мороз
Надійшла до редакції 12.09.2015 р.

Д.Б. Рахметов¹, Н.Я. Левчик¹, Л.М. Шпак¹,
В.П. Грахов¹, Е.Н. Бойко¹, А.В. Любинская¹,
С.А. Рахметова¹, В.М. Завгородній²

¹ Национальный ботанический сад
им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Украина, г. Киев

² Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Украина, г. Киев

ИНТРОДУКЦИЯ РАСТЕНИЙ *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI В НАЦИОНАЛЬНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ИМ. Н.Н. ГРИШКО НАН УКРАИНЫ

Приведены результаты многолетних исследований *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii, в частности особенности морфологии растений и размножения, компонентный состав и приемы культивирования. Растения характеризуются ценными лекарственными и пищевыми свойствами и являются перспективными интродуцентами в Украине. В НБС им. Н.Н. Гришко НАН Украины создан генофонд растений, который насчитывает свыше 20 форм. Разработаны условия и подобраны питательные среды для введения в культуру и длительного сохранения растений в условиях *in vitro*, а также для их регенерации из листовых эксплантов. Определено содержание антиоксидантов (флавоноидов и аскорбиновой кислоты) в фитосырье стевии. Установлено, что в листьях *S. rebaudiana* накапливается в среднем около 6-7 % (от абс. сухой массы) дитерпеновых гликозидов. Это динамичный показатель, который зависит от формы и условий культивирования. Максимальное накопление стевиозидов наблюдается у растений открытого грунта в фазу бутонизации. Растения *S. rebaudiana* независимо от формы и условий культивирования (открытый или закрытый грунт, *in vitro*) характеризуются низким уровнем устойчивости к засухе. Растения, произрастающие в почвенных условиях, отличаются более высокой засухоустойчивостью по сравнению с растениями, произрастающими в условиях *in vitro*. Наибольшая вододерживающая способность, как в почвенных условиях, так и в условиях *in vitro*, установлена у формы R100, наименьшая — у формы 3Т.

Ключевые слова: интродукция, *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii, стевиозиды, флавоноиды, аскорбиновая кислота, длительное хранение, засухоустойчивость.

D.B. Rakhmetov¹, N.Ya. Levchuk¹, L.M. Shpak¹,
V.P. Hrakhov¹, O.M. Boiko¹, A.V. Lyubinska¹,
S.O. Rakhmetova¹, V.M. Zavorodniy²

¹ M.M. Gryshko National Botanical Garden,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv

² National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Ukraine, Kyiv

INTRODUCTION OF *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI PLANTS IN M.M. GRYSHKO NATIONAL BOTANICAL GARDEN OF THE NAS OF UKRAINE

The results of long-term studies of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni are presented, viz. plant morphology parameters, propagation, cultivation, constituents. Stevia is characterized by significant food and medicinal properties and is promising introduced species in Ukraine. In M.M. Gryshko National Botanical Garden the valuable gene pool is accumulated which has numbered more than 20 forms. The nutritional media and environment needs for intro-

duction to the culture *in vitro* and long-term storage of plant and also their regeneration from leaf explants. The content of antioxidants (flavonoids and ascorbic acid) in stevia raw material has been evaluated. The leaves of *Stevia rebaudiana* have been accumulated the diterpeneglycosides up to approximately 6-7 % (to dry weight). This is dynamic indicator that depends on *Stevia* form and cultivation conditions. Maximal accumulation of steviosides was observed in open ground plants in budding-blooming phases. *Stevia rebaudiana* plants regardless of the form and the cultivation conditions (open and protected ground, *in vitro*) are characterized by low levels of drought tolerance. Plants growing in open ground conditions demonstrate higher drought tolerance compared with plants *in vitro*. The biggest water-retaining capacity, both in soil and *in vitro* conditions, is found in form R100, the lowest — in form 3T.

Key words: introduction, *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, steviosides, flavonoids, ascorbic acid, long-term deposit, drought tolerance.