

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin  
e-mail: rdolinski@op.pl

ROMUALD DOLIŃSKI, EWELINA JABŁOŃSKA

**Mikrorozmnażanie stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)  
z eksplantatów węzłowych izolowanych  
z roślin wytworzonych *in vitro***

Micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) through node explants  
isolated from *in vitro* produced plants

**Streszczenie.** Głównym celem badań była ocena populacji *Stevia rebaudiana* pod względem zdolności do mikrorozmnażania z eksplantatów węzłowych. Pierwotnymi eksplantatami były wierzchołki pędów pobrane z roślin rosnących w szklarni. Eksplantaty węzłowe wycięto ze sterylizowanych roślin wytworzonych *in vitro*. Wyłożono je na pożywkę MS uzupełnioną różnymi stężeniami BAP (0,5–4 mg·dm<sup>-3</sup>). Po trzech tygodniach przełożono eksplantaty na świeże pożywki z tymi samymi stężeniami BAP i GA<sub>3</sub> w stężeniu 0,1 mg·dm<sup>-3</sup>. W czasie trzech następnych tygodni wszystkie eksplantaty zregenerowały pędy. Maksymalne formowanie pędów (średnio 11,36 z eksplantatu) stwierdzono na pożywce zawierającej 1,0 mg·dm<sup>-3</sup> BAP i 0,1 mg·dm<sup>-3</sup> GA<sub>3</sub>. Wszystkie kombinacje BAP i GA<sub>3</sub> wytwarzały dużo kalusa. Rozwinęło się go najwięcej na pożywce MS zawierającej BAP w stężeniu 1,0 mg·dm<sup>-3</sup>. Pędy ukorzeniano w pożywce MS uzupełnianej różnymi stężeniami IBA (0,25–2 mg·dm<sup>-3</sup>). W czasie 5 tygodni wszystkie pędy wytworzyły korzenie. Najwięcej korzeni (10,04) otrzymano przy 1,0 mg·dm<sup>-3</sup> IBA. 40 roślin wysadzono do doniczek wypełnionych sterylną mieszanką glebową i poddano procesowi hartowania. Proces aklimatyzacji przeżyło 92,5% roślin.

**Słowa kluczowe:** *Stevia rebaudiana*, mikrorozmnażanie, eksplantaty węzłowe

**Skróty:** BAP – 6-benzylamino puryna, 2iP – 2-izopentyloadenina, GA<sub>3</sub> – kwas gibberelinowy, IAA – kwas indolilo-3-octowy, IBA – kwas indolilo-3-masłowy, KIN – kinetyna, NAA – kwas naftylo-1-octowy

WSTĘP

*Stevia rebaudiana* jest cenną rośliną z rodziny *Asteraceae*, wykorzystywaną do celów spożywczych i leczniczych, pochodzi z północnej części Paragwaju [Soejarto 2002]. Jej najważniejszą właściwością jest intensywny słodki smak, który zawdzięcza specy-

ficznym glikozydom diterpenowym. Występują one we wszystkich organach rośliny, ale jest ich najwięcej w liściach. Wyizolowano z nich 8 rodzajów glikozydów, w największych ilościach występują i mają największy wpływ na jakość i poziom słodkości stewiozyd i rebaudiozyd A [Brandle i in. 1998, Kennelly 2002, Starratt i in. 2002]. Ludzki przewód pokarmowy nie trawi słodkich glikozydów, w konsekwencji tego nie podnoszą one stężenia cukru we krwi, nie biorą udziału w procesach energetycznych i nie dostarczają kalorii. Poza glikozydami roślina zawiera dużo cennych składników pokarmowych i leczniczych [Kennelly 2002]. Badania wykonane na zwierzętach wykazały, że stewia i izolowane z niej glikozydy nie dają szkodliwych efektów ubocznych [Genus 2003, Megaji i in. 2005]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) uznała za bezpieczną dzienną dawkę spożycia słodkich glikozydów na poziomie  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  masy ciała [Benford i in. 2006].

W gastronomii i przemyśle spożywczym sproszkowane liście stewii, standaryzowane ekstrakty i czyste glikozydy są używane do słodzenia i przyprawiania żywności. Pełnią rolę substytutów cukru produkowanego z buraków i trzciny cukrowej [Savita i in. 2004, Lemus-Mondaca i in. 2012]. Suche liście są od cukru słodsze 20–30 razy, czysty ekstrakt glikozydów przewyższa pod względem poziomu słodkości sacharozę 300 razy [Liu i Li 1995, Cardello i in. 1999]. W procesach przygotowywania żywności ważne jest to, że słodkie glikozydy są stabilne chemicznie, nie fermentują i są odporne na temperaturę  $100^\circ\text{C}$  [Savita i in. 2004, Huxtable 2002].

Dla medycyny ważne są nie tylko słodkie glikozydy, ale również inne metabolity wtórne, które m.in. nadają stewii właściwości antymikrobowe. Stewia jest dobrym źródłem słodczy dla ludzi chorych na cukrzycę i hipoglikemię oraz przy wysokim ciśnieniu krwi, otyłości i przewlekłych zakażeniach drożdżami [Huxtable 2002, Debnath 2008]. Przemysł farmaceutyczny stosuje słodkie glikozydy do poprawiania smaku gorzkich tabletek i syropów, używa ekstraktów do produkcji preparatów do ochrony zębów przed próchnicą [Matsukubo 2006].

*S. rebaudiana* jest rośliną ciepłolubną krótkiego dnia, ale jest uprawiana w różnych strefach klimatycznych. W klimacie tropikalnym i subtropikalnym jest byliną, w klimacie umiarkowanym rośliną jednoroczną. Na skalę komercyjną uprawia się już stewię w wielu krajach (Brazylia, Chiny, Indie, Japonia, Kanada, Korea, Malezja, Paragwaj, USA), w innych jest intensywnie propagowana. Tradycyjnie rozmnaża się ją za pomocą nasion i sadzonek pędowych. Przy rozmnażaniu generatywnym dużym problemem jest słabe kiełkowanie nasion [Felippe i in. 1971, Carneiro i in. 1997]. Powstają plantacje z dużą zmiennością wielu ważnych cech, między innymi rośliny różnią się pod względem szybkości wzrostu, terminu kwitnienia i ilości słodkich glikozydów [Nakamura i Tamura 1985]. Rozmnażanie wegetatywne pozwala na produkcję bardzo wyrównanych sadzonek, ale jest mało wydajne i może prowadzić do kumulacji patogenów [Sakaguchi i Kan 1982].

Z powodu trudności z zakładaniem dużych plantacji stewii tradycyjnymi metodami dobrą alternatywą może być produkcja sadzonek w kulturach *in vitro*. Mikro-rozmnażanie umożliwia szybkie mnożenie wybranych roślin. Dużą stabilność genetyczną zapewniają techniki wykorzystujące eksplantaty z pąkami [Bach i Pawłowska 2009]. Badania wykazały, że stewię można w kulturach *in vitro* mnożyć z wierzchołków pędów [np. Das i in. 2011, Jagatheeswari i Ranganathan 2012] i eksplantatów węzłowych [Rafiq i in. 2007, Verma i in. 2011]. W badaniach wykonanych

wcześniej indukcja organogenezy i regeneracja pędów zachodziły na jednej pożywce, bez pasażowania kultur. Przedłużanie tego etapu mikrorozmnażania do 5–6 tygodni prowadziło do tworzenia większej liczby pędów, były one słabo wyrównane, ale przeważały pędy duże, zdolne do szybkiej ryzogenezy [Yang i in. 1981, Ahmed i in. 2007]. Przy skracaniu etapu mnożenia pędów do 3–2 tygodni otrzymywano więcej pędów małych i cienkich, niezdolnych do szybkiej ryzogenezy [Laribi i in. 2012, Rafiq i in. 2007]. Verma i in. 2011 przenieśli krótkie, cienkie pędy stewii do pożywek elongacyjnych, które zawierały różne stężenia  $GA_3$ . Po czterech tygodniach stwierdzili korzystny wpływ gibereliny na dalszy rozwój pędów.

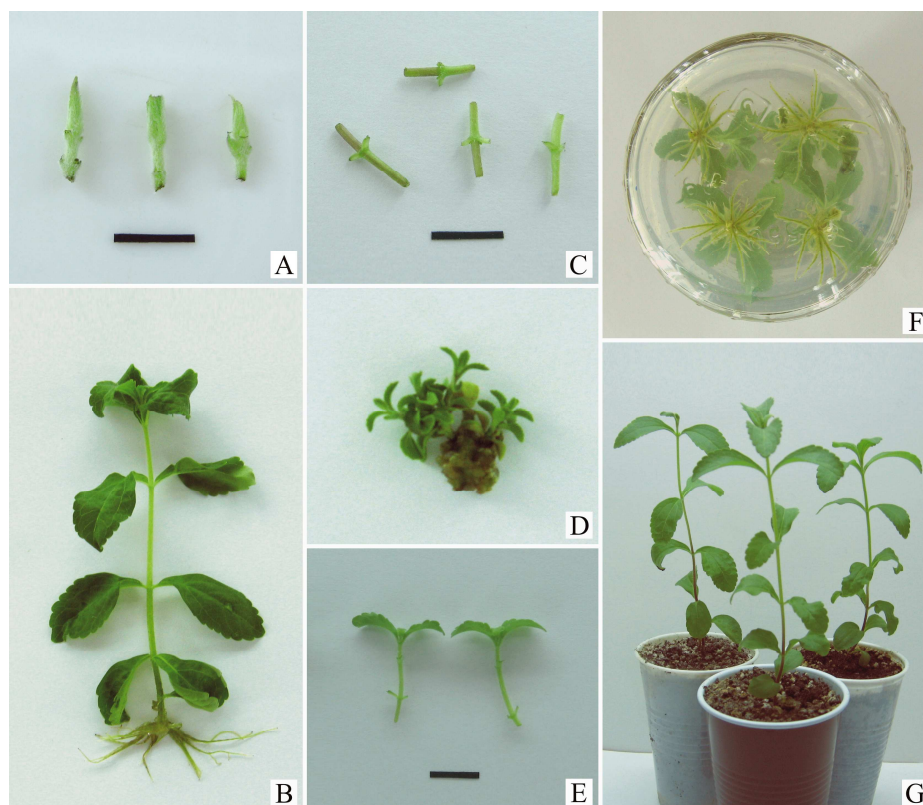
Głównym celem naszych badań była ocena populacji stewii pod względem zdolności do mikrorozmnażania z eksplantatów węzłowych. Badaliśmy wpływ różnych stężeń cytokininy BAP i auksyny IBA na efektywność mnożenia i ukorzenia pędów. Podjęliśmy próbę poprawienia właściwości mikropędów przez pasażowanie kultur z pożywek zawierających różne stężenia cytokininy na pożywki wzbogacone gibereliną  $GA_3$ .

#### MATERIAŁ I METODY

W kolejnych etapach mikrorozmnażania wykorzystywano pożywkę MS [Murashige i Skoog 1962], uzupełnianą odpowiednimi regulatorami wzrostu, i szklane naczynia o pojemności  $0,4 \text{ dm}^3$ . Zawierały zestalone agarem pożywki (25 ml), po założeniu kultury *in vitro* zamykano je folią aluminiową i ustawiano na półkach pokoju wzrostowego z temperaturą  $24^\circ\text{C}$ , światłem białym o natężeniu  $30\text{--}40 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  i fotoperiodem 12/12.

Z 30 półrocznych roślin stewii rosnących w szklarni pobrano eksplantaty wierzchołkowe o długości około 1 cm (fot. 1A). Odkazono je przez 7 minut w 0,1%  $\text{HgCl}_2$ , wypłukano w sterylnej wodzie i po osuszeniu na bibule umieszczono pionowo po 4 w pojemnikach, w zestalonej agarem (0,8%) pożywce MS uzupełnionej IAA w stężeniu  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . W fitotronie w czasie 4 tygodni rozwinęły się z nich sterylne rośliny (fot. 1B). W „komorze szczepień” wycięto z nich eksplantaty węzłowe o długości 1–1,5 cm (fot. 1C). Wyłożono je do naczyń na powierzchnię 4 pożywek, które różniły się stężeniami cytokininy BAP ( $0,5\text{--}4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Każda kombinacja doświadczalna składała się z 20 powtórzeń. Indukcja organogenezy trwała 3 tygodnie, potem przeniesiono eksplantaty na świeże pożywki. Oprócz wcześniej stosowanych stężeń BAP zawierały one giberelinę  $GA_3$  w stężeniu  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Regeneracja pędów trwała 3 tygodnie, później dla 30 eksplantatów z każdej pożywki oznaczono: liczbę i masę pędów, długość średniego pędu i masę eksplantatów z kalusem.

Od eksplantatów niepoddanych ocenie odcięto pędy o długości 2–2,5 cm (fot. 1C). Umieszczano je po 4 w naczyniach z pożywkami ukorzeniającymi. Stosowano pożywkę MS ze zmniejszoną zawartością sacharozy ( $15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), kombinacje doświadczalne różniły się stężeniami auksyny IBA ( $0,25\text{--}1,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Po 5 tygodniach dla 30 roślin z każdej pożywki oceniono ilość kalusa w skali 5-stopniowej, największe kalusy oceniano na  $5^\circ$ , a najmniejsze otrzymały ocenę  $1^\circ$ . Rośliny wydobywano z naczyń, oczyszczano z pożywek i oznaczano takie cechy, jak masa i długość pędu oraz masa, liczba i długość korzeni.



Fot. 1. Mikrorozmnażanie stewii: A – eksplantaty wierzchołkowe (pierwotne), B – sterylna roślina, C – eksplantaty węzłowe (wtórne), D – pędy i kalus rozwinięte na eksplantacie węzłowym, E – pędy przed ukorzeniem, F – korzenie zregenerowanych roślin, G – dobrze ukorzone, zahartowane sadzonki stewii. Skala = 1 cm

Photo. 1. Micropropagation of stevia: A – shoot tip explants (primary), B – sterile plant, C – node explants (secondary), D – shoots and callus developed on node explant, E – shoots before rooting, F – roots of regenerated plants. G – well-rooted, hardened stevia cuttings. Scale = 1 cm

Ostatnim etapem badań była aklimatyzacja. Korzenie 40 roślin oczyszczono z pożywek i wypłukano w sterylnej wodzie. Rośliny wysadzono do plastikowych doniczek  $0,33 \text{ dm}^3$  ze sterylną mieszaniną piasku, perlitu i ziemi ogrodniczej (1 : 1 : 3), przykryto plastikowymi pojemnikami i przeniesiono do szklarni. Po tygodniu przykrycia co kilka godzin uchylano na 15–20 minut, potem (po 4 dobach) całkowicie je usunęto. Wyniki aklimatyzacji oceniono po 4 tygodniach liczonych od wysadzenia roślin do sterylnego podłoża.

Kolejne etapy mikrorozmnażania stewii dokumentowano fotograficznie. Wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji dla danych ortogonalnych. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami ocenianych cech w kombinacjach doświadczalnych szacowano metodą przedziałów ufności T Tukeya [Oktaba 2000].

## WYNIKI I DYSKUSJA

W naszych badaniach eksplantaty węzłowe stewii pochodziły z roślin wytworzonych w kulturze *in vitro*, nie wymagały odkażania i mogło to mieć duży wpływ na wyniki mnożenia pędów. Taki sposób postępowania stosowano we wcześniejszych badaniach zmierzających do opracowania wydajnej procedury mnożenia pędów. W ten sposób eliminowano ujemny wpływ odkażania na przebieg organogenezy. Yang i in. [1981] oraz Rafiq i in. [2007] izolowali eksplantaty węzłowe stewii ze sterylnych siewek. W badaniach innych autorów materiał pochodził z kultur *in vitro* zakładanych z fragmentów roślin rosnących w szklarni albo na polu [np. Ahmed i in. 2007, Verma i in. 2011, Laribi i in. 2012].

Badaliśmy wpływ różnych stężeń BAP i niskiego stężenia GA<sub>3</sub> na indukcję organogenezy i regenerację pędów stewii. Nie porównywaliśmy działania różnych stężeń cytokininy z pożywką MS bez regulatorów wzrostu. Wielu autorów wcześniejszych badań używało takiej pożywki jako kontrolnej. Wydajność mnożenia pędów stewii była na niej gorsza niż na pożywkach z hormonami, indukcja organogenezy opóźniała się, rozwijało się mniej pędów [Yang i in. 1981, Anbazhagan i in. 2010, Verma i in. 2011, Rafiq i in. 2007, Laribi i in. 2012]. Autorzy innych prac nie używali pożywek kontrolnych, porównywali tylko działanie cytokinin stosowanych oddzielnie albo w kombinacjach z auksynami [Ahmed i in. 2007, Debnath 2008, Thiyagarajan i Venkatachalan 2012].

Na wszystkich pożywkach indukcyjnych początki rozwoju pędów obserwowaliśmy po 7–8 dniach. Autorzy większości wcześniej opublikowanych prac nie podają żadnych informacji o szybkości indukcji organogenezy na eksplantatach węzłowych stewii [Yang i in. 1981, Anbazhagan i in. 2010, Jagatheeswari i Ranganathan 2012, Laribi i in. 2012, Thiyagarajan i Venkatachalam 2012]. W badaniach Debnath [2008] na większości z 8 pożywek z różnymi stężeniami cytokinin BAP i KIN stosowanych oddzielnie i w 6 kombinacjach BAP z IAA początki rozwoju pędów obserwowano przed upływem 2 tygodni. W eksperymencie opisanym przez Verma i in. [2011] szybkość indukcji organogenezy pędowej zależała od proporcji pomiędzy cytokininą BAP i auksyną NAA. Rozwój pędów rozpoczynał się najszybciej (średnio po 5,7 dnia) na pożywce MS zawierającej 2 mg·dm<sup>-2</sup> BAP i 0,5 mg·dm<sup>-2</sup> NAA, a najwolniej (po 14,8 dnia) na pożywce bez hormonów.

W naszych badaniach po 3 tygodniach indukcji organogenezy pędowej pasażowano eksplantaty na pożywki wzbogacone gibereliną. W tym czasie nie liczone pędów i nie oceniano rozmiarów kalusów, gdyż były one jeszcze bardzo małe (>2–3 mm). Ocenę efektów mnożenia pędów wykonano po następnym 3 tygodniach. Wszystkie pędy rozwijały się z pąków, nie stwierdzono powstawania pędów przybyszowych. Yang i in. [1981] obserwowali rozwój takich pędów w kalusie stewii, który powstał na eksplantatach węzłowych. Po 50 dniach kultur *in vitro* pędy przybyszowe występowały na wszystkich pożywkach z BAP, ich ilość rosła wraz ze wzrostem stężeń cytokininy (od 1 do 10 mg·dm<sup>-3</sup>). Pędy przybyszowe nie rozwijały się przy niskich stężeniach 2iP i KIN, pojawiły się natomiast w małych ilościach przy najwyższym stężeniu tych cytokinin.

Na morfologiczną budowę pędów wpłynęła korzystnie giberelina, dodana w niskim stężeniu do pożywek regeneracyjnych. Wytworzyły się stosunkowo grube łodygi i dobrze rozwinięte liście (fot. 1 D i E). Korzystny wpływ niskich stężeń GA<sub>3</sub> na regenerację

pędów stewii obserwowano wcześniej w badaniach wykonanych przez Verma i in. [2011].

W czasie 6 tygodni pędy rozwinęły się na wszystkich eksplantatach węzłowych. Stwierdzono istotny wpływ wzrostu stężeń cytokininy w pożywkach indukcyjnych i regeneracyjnych na efektywność mnożenia pędów. Najwięcej pędów (średnio 10,47 i 11,36) powstało na eksplantatach umieszczonych na pożywkach z najniższymi stężeniami cytokininy (0,5 i 1 mg·dm<sup>-3</sup>). Średnia liczba pędów na eksplantacie malała wraz ze wzrostem stężeń BAP i przy najwyższym stężeniu hormonu było ich tylko 4,71. Podobne zależności obserwowano dla średniej masy wszystkich pędów na eksplantacie i średniej długości pędu (tab. 1). Średnia masa pędu była natomiast najmniejsza (37,7 mg) na pożywce z najniższym stężeniem BAP, rosła wraz ze wzrostem stężeń cytokininy. We wszystkich kombinacjach doświadczalnych obserwowano dużą zmienność fenotypową, dotyczyła ona wszystkich ocenianych cech. Na wielu eksplantatach indukcja organogenezy opóźniła się, miało to duży wpływ na ostateczną liczbę i rozmiary pędów. W czasie oceny efektów mnożenia na wszystkich eksplantatach obok pędów większych występowały małe, słabiej rozwinięte (fot. 1D).

Tabela 1. Indukcja organogenezy i regeneracja pędów z eksplantatów węzłowych

Table 1. Organogenesis induction and shoots regeneration from node explants

Cecha Feature		Cytokinina/ Cytokinin (BAP mg·dm <sup>-3</sup> )				Średnia Mean	NIR <sub>0,05</sub> LSD <sub>0,05</sub>
		0,5	1,0	2,0	4,0		
Liczba pędów Shoots number	$\bar{x}$	10,47	11,36	7,07	4,71	8,40	1,12
	V	25	23	24	28	25	–
Masa pędów Shoots weight (mg)	$\bar{x}$	406	507	306	202	355	112
	V	55	48	46	58	52	–
Masa pędu Shoot weight (mg)	$\bar{x}$	37,7	43,5	44,0	45,5	42,7	2,34
	V	38	38	45	56	44	–
Długość pędu Shoot length (cm)	$\bar{x}$	1,94	1,99	1,70	1,44	1,77	0,09
	V	22	21	23	28	24	–
Masa kalusa Callus weight (mg)	$\bar{x}$	737	854	737	587	729	106
	V	34	36	29	26	31	–

$\bar{x}$  – średnia / mean; V – współczynnik zmienności (%) / variability coefficient (%)

W badaniach wykonanych na *Stevia rebaudiana* wcześniej wydajność mnożenia pędów oceniano głównie na podstawie takich cech, jak procentowy udział eksplantatów z pędami i średnia liczba pędów na eksplantacie. Nie oznaczano masy pędów, w niektórych pracach podano ich średnią długość. Efekty mnożenia pędów zależały głównie od hormonalnego składu pożywek i czasu trwania tego etapu mikrorozmnażania. Z literatury wynika, że na procentowy udział eksplantatów z pędami ma duży wpływ długość etapu

mnożenia pędów. Duże skracanie indukcji organogenezy i regeneracji pędów prowadzi do tego, że coraz więcej eksplantatów nie indukuje się i nie tworzy pędów. Można to wykazać, posługując się pracami, w których stosowano pożywki kontrolne. W badaniach Yang i in. [1981] ten etap mikrorozmnażania trwał 7 tygodni, pędy rozwinęły się na wszystkich eksplantatach. Na pożywce MS bez hormonów z jednego eksplantatu otrzymano średnio 2,1 pędu. Rafiq i in. [2007] skrócili czas indukcji i regeneracji pędów do 3 tygodni. Na pożywce kontrolnej 72% eksplantatów wytworzyło pędy, średnia liczba pędów na eksplantacie była mniejsza (1,62). W eksperymencie opisanym przez Laribi i in. [2012] etap mnożenia pędów trwał tylko 2 tygodnie. Na pożywce kontrolnej tylko 49,5% eksplantatów rozwinęło pędy, średnia liczba pędów na eksplantacie zmalała do 0,68.

W badaniach porównujących działanie różnych cytokinin stosowanych samodzielnie (bez dodawania innych hormonów) efekty działania BAP były istotnie lepsze od otrzymywanych przy stosowaniu tych samych stężeń KIN. Optymalne działanie wykazały różne stężenia BAP. W badaniach Yang i in. [1981] najwięcej pędów (średnio 13,8) rozwinęły eksplantaty węzłowe na pożywce MS uzupełnionej przez  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP. W badaniach Ahmed i in. [2007] optymalnym działaniem (średnio 5,8 pędu) wykazała się pożywka zawierająca  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP. Anbazhagan i in. [2010] otrzymali najwięcej pędów (średnio 8,2) na eksplantatach wyłożonych na pożywkę MS z BAP w stężeniu  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W badaniach Thiagarajan i Venkatachalam [2012] optymalnym stężeniem BAP okazał się poziom  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , przy którym średnia liczba pędów na eksplantacie wyniosła 15,7.

Z badań niektórych autorów wynika, że jeszcze lepsze efekty mnożenia pędów stewii można otrzymać przy wykorzystywaniu pożywek zawierających BAP w kombinacjach z niskimi stężeniami KIN oraz na niektórych pożywkach uzupełnianych BAP i auksynami. W badaniach Ahmed i in. [2007] lepiej od pożywki z optymalnym stężeniem BAP działała pożywka MS uzupełniona przez  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  KIN, na której średnia liczba pędów na eksplantacie była większa (8,75). Verma i in. [2011] otrzymali najlepsze wyniki mnożenia pędów stewii na pożywce MS wzbogaconej o cytokininy BAP i KIN stosowane w stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , średnia liczba pędów na eksplantacie wyniosła 17,5. A z kolei w badaniach Anbazhagan i in. [2010] lepiej od pożywki z optymalnym stężeniem BAP działała pożywka zawierająca  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  IAA.

W naszych badaniach wszystkie eksplantaty węzłowe tworzyły kalus. Na rozwój tej tkanki miał istotny wpływ hormonalny skład pożywek. W czasie oceny efektów mnożenia pędów największą średnią masę (854 mg) miały kalusy na pożywce zawierającej  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  GA<sub>3</sub>, istotnie słabszy rozwój kalusa stwierdzono przy najniższym i najwyższym stężeniu cytokininy (tab. 1).

Z literatury wynika, że intensywny rozwój kalusa ma negatywny wpływ na wydajność mnożenia pędów na drodze bezpośredniej organogenezy. Kalus konkuruje z pędami o składniki pokarmowe, mogą się z niego rozwijać pędy przybyszowe, co zwiększa częstotliwość zmienności somaklonalnej [Larkin i Scowcroft 1981]. We wszystkich badaniach wykonanych wcześniej na stewii kalus nie rozwijał się na pożywce MS bez regulatorów wzrostu, pojawiał się natomiast na niektórych pożywkach z cytokininami i z kombinacjami cytokinin i auksyn. W badaniach Yang i in. [1981] kalus rozwijał się intensywnie na eksplantatach węzłowych umieszczonych na pożywkach z BAP, jego ilość

rosła wraz ze wzrostem stężeń cytokininy. Małe ilości tej tkanki powstały przy wysokich stężeniach KIN i 2iP. Również Rafiq i in. [2007] obserwowali intensywny wzrost kalusa na pożywkach zawierających BAP, mniejsze ilości tej tkanki pojawiały się na pożywkach zawierających KIN i przy stosowaniu cytokinin razem z auksyną IAA. Thiyagarajan i Venkatachalam [2012] nie obserwowali rozwoju kalusa na pożywkach z różnymi stężeniami BAP i IAA, pojawił się on natomiast na pożywkach zawierających BAP w kombinacjach z IBA i NAA.

Etap ukorzenia pędów trwał 5 tygodni, w tym czasie wszystkie pędy wytworzyły korzenie. Na wszystkich pożywkach początki ryzogenezy obserwowano już po 4–5 dniach, ale stwierdzono dużą zmienność. Na wielu pędach rozwój korzeni opóźniał się, na niektórych pierwsze korzenie pojawiły się dopiero po 3 tygodniach. Rozwojowi korzeni towarzyszył kalus, ale nie stwierdzono powstawania korzeni na drodze pośredniej organogenezy. Kalusy miały luźną strukturę i często rozpadały się w czasie oczyszczania korzeni z pożywek, dlatego ich rozmiary oceniano na roślinach znajdujących się w naczyniach (fot. 1D). Średnie oceny kalusów były niskie, wahały się od 1,93 do 2,32° i nie różniły się istotnie. Obliczenia statystyczne nie wykazały też istotnych różnic w średniej masie roślin (305–355 mg) oraz średniej masie pędu (126–184 mg) i korzeni (100–132 mg). Było to związane z występowaniem dużej zmienności fenotypowej (tab. 2). Obliczenia wykonane na średnich otrzymanych dla masy roślin i masy korzeni wykazały, że udział korzeni w masie roślin wzrastał wraz ze wzrostem stężeń IBA. Średnia długość pędu była istotnie większa u roślin rozwijających się przy najwyższym stężeniu IBA niż u roślin z innych pożywek. Pędy roślin otrzymanych na pożywkach z najniższymi stężeniami auksyny miały więcej węzłów niż pędy z pożywek z wyższymi stężeniami IBA. Najwięcej korzeni (średnio 10,04) miały rośliny z pożywki zawierającej 1,0 mg·dm<sup>-3</sup> IBA, na innych pożywkach powstało ich mniej. Korzenie roślin zregenerowanych przy niskich stężeniach IBA były dłuższe od korzeni rozwijających się przy wyższych stężeniach auksyny (tab. 2).

W literaturze nie znaleziono informacji na temat masy roślin stewii wytwarzanych w kulturach *in vitro* i proporcji w jej podziale pomiędzy pędami i korzeniami. Wydajność ryzogenezy oceniano na podstawie procentu ukorzenionych pędów oraz liczby i długości korzeni. Zwracano też uwagę na rozwój kalusa. Używano pożywek zestalanych agarom (0,7–0,8%), często porównywano działanie pożywek bez hormonów z pożywkami uzupełnianymi auksynami. Niektórzy autorzy używali tylko pożywek z auksynami. Wydajność ukorzenia pędów zależała głównie od stosowanych regulatorów wzrostu. W badaniach Yang i in. [1981] etap ukorzenia pędów trwał 2 tygodnie. W pożywce MS bez hormonów korzenie wytworzyło 69% pędów, średnia liczba korzeni na roślinie była mała (1,2). Pożywki z niskimi stężeniami NAA dały efekty zbliżone do kontroli, przy wyższych stężeniach auksyny korzenie powstały na wszystkich pędach i było ich więcej (5,4 i 8,0). Kalus nie rozwinął się w pożywce kontrolnej i przy najniższym stężeniu NAA (0,01 mg·dm<sup>-3</sup>), na pozostałych pożywkach ilość kalusa rosła wraz ze stężeniami NAA. W badaniach Ahmed i in. [2007] w czasie 5 tygodni korzenie nie powstały w pożywce MS bez hormonów. Pożywki zawierające IAA działały lepiej od pożywek z NAA i IBA. Wszystkie auksyny działały najlepiej w najniższym stężeniu, wraz ze wzrostem stężeń hormonów coraz mniej pędów tworzyło korzenie, malała też ich liczba. Na pożywce z optymalnym stężeniem IAA (0,1 mg·dm<sup>-3</sup>) ukorzeniło się 97,7% pędów, korzenie miały średnią długość 2,12 cm i było ich najwięcej (12,1). Przy tych samych stężeniach NAA i IBA udział pędów z korzeniami był mniejszy, rozwinęło



Tabela. Wpływ różnych stężeń IBA na formowanie korzeni i wzrost pędów  
 Table 2. Effect of different concentrations of IBA on root formation and shoot growth

Cecha Feature		Auksyna/ Auxin (IBA mg dm <sup>-3</sup> )				Średnia Mean	NIR <sub>0,05</sub> LSD <sub>0,05</sub>
		0,25	0,5	1,0	1,5		
Ilość kalusa Callus qantity (1–5°)*	$\bar{x}$	1,86	2,32	1,79	1,93	1,97	ni/ ns
	V	38	39	35	37	37	-
Masa rośliny Plant weight (mg)	$\bar{x}$	326	347	355	305	333	ni/ ns
	V	37	39	35	30	35	-
Masa pędu Shoot weight (mg)	$\bar{x}$	226	221	224	184	214	ni/ ns
	V	37	42	38	29	37	-
Masa korzeni Roots weight (mg)	$\bar{x}$	100	126	132	121	120	ni/ ns
	V	49	45	33	42	42	-
Udział korzeni Roots share (%)	$\bar{x}$	30,7	36,3	37,2	39,7	36,0	-
Długość pędu Shoot lenght (cm)	$\bar{x}$	5,41	5,20	5,16	4,19	4,99	0,60
	V	27	24	25	30	27	-
Liczba węzłów Nodes number	$\bar{x}$	4,60	4,46	4,0	3,36	4,11	0,37
	V	18	17	15	19	18	-
Liczba korzeni Roots number	$\bar{x}$	7,79	7,86	10,04	7,14	8,21	1,60
	V	51	35	30	30	37	-
Długość korzenia Root lenght (cm)	$\bar{x}$	1,45	1,41	9,2	7,2	1,13	0,15
	V	30	16	19	27	23	-

\* w skali, gdzie: 1° – bardzo słaby rozwój kalusa, 5° – bardzo intensywny rozwój kalusa/ in scale, where: 1° – very feeble callusing, 5° – very intense callusing;

ni/ ns – różnica nieistotna/ difference not significan;  $\bar{x}$  – średnia/ mean; V – współczynnik zmienności (%) / variability coefficient (%)

się mniej korzeni, ale były dłuższe. Kalus rozwijał się na wszystkich pożywkach zawierających NAA, jego ilość rosła wraz ze wzrostem stężeń auksyny. Na pożywkach z IBA kalusa było mniej, a przy stosowaniu IAA rozwinął się tylko przy najwyższym stężeniu hormonu. Anbazhagan i in. [2010] używali do ukorzenia pędów stewii półstężonej pożywki N<sub>6</sub> bez hormonów i z różnymi stężeniami 3 auksyn. Nie obserwowano wówczas formowania korzeni w pożywce kontrolnej. Wszystkie auksyny najlepiej działały w stężeniu 1 mg dm<sup>-3</sup>, niższe i wyższe stężenia dały gorsze efekty. W czasie 5 tygodni w pożywce z optymalnym stężeniem IAA ukorzeniło się 93% pędów, średnia liczba korzeni była największa (11,8), miały one średnią długość 4,8 cm. Przy tym samym stężeniu IBA ukorzeniło się 86% pędów, powstało mniej korzeni (10,4) i były one krótsze (średnio

4,0 cm). W badaniach Laribi i in. [2012] w czasie 2 tygodni w pożywce kontrolnej ukorzeniło się 58,46% pędów, rozwinęło się mało korzeni (średnio 2,86) i miały one małą średnią długość (0,84 cm). Pożywki z NAA dały lepsze efekty od pożywek z IBA. W pożywce z NAA w stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  ukorzeniło się 97% pędów, średnia liczba korzeni na roślinie wyniosła 8,9, a średnia długość 1,7 cm.

W naszych badaniach aklimatyzację przeżyło 92,5% roślin. W czasie 4 tygodni spośród 40 roślin poddanych hartowaniu zmarły tylko 3, pozostałe dobrze zniosły obniżanie wilgotności powietrza, zmienne temperatury i zmiany natężenia światła.

W badaniach innych autorów wyniki aklimatyzacji zależały głównie od składu mieszanek glebowych i szybkości hartowania. Najlepsze efekty dała dwuetapowa strategia hartowania zastosowana w badaniach Verma i in. [2011]. Rośliny przeniesiono z pożywki do szklanych naczyń ze sterylnym agrotorfem zwilżonym rozcieńczoną (25%) pożywką MS bez związków organicznych. Naczynia zakryto plastikowymi kapslami i wstawiono do pokoju wzrostowego. Przez 3 tygodnie redukowano wilgotność powietrza przez uchylanie kapsli. Potem przesadzono rośliny do doniczek z mieszaniną piasku, gleby i wermikulitu (2 : 1 : 1) i przez 6 tygodni trzymano w szklarni. Aklimatyzację przeżyło 94,8% roślin. Thiyagarajan i Venkatachalam [2012] wysadzili oczyszczone z pożywek rośliny do doniczek ze sterylną mieszaniną gleby i piasku (1 : 2), przykryli je plastikowymi pojemnikami i przez 2 tygodnie trzymali w fitotronie, potem usunęli przykrycia i na 3 tygodnie przenieśli doniczki do szklarni. W tym doświadczeniu hartowanie przeżyło 65,8% roślin.

#### WNIOSKI

1. Badany materiał stewii charakteryzował się dużą zdolnością do organogenezy z eksplantatów węzłowych.

2. W czasie 6 tygodni wszystkie eksplantaty wytworzyły pędy. Najwięcej pędów (11,36) powstało na pożywce MS uzupełnionej o  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  GA<sub>3</sub>.

3. Stwierdzono korzystny wpływ niskiego stężenia gibereliny na morfologiczną budowę pędów. Miały one dobrze rozwinięte liście i stosunkowo grube łodygi. Rozwojowi pędów towarzyszył kalus, ale nie stwierdzono pośredniej organogenezy.

4. Pędy ukorzeniały się łatwo, w czasie 5 tygodni wszystkie wytworzyły rośliny. Kombinacje doświadczalne nie różniły się istotnie pod względem średniej masy roślin. Nie stwierdzono też różnic dla masy pędów i masy korzeni.

5. Stężenia IBA miały istotny wpływ na morfologiczną budowę roślin. Rośliny otrzymane przy najwyższym stężeniu auksyny ( $1,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) wyróżniły się najmniejszą liczbą i najmniejszą długością korzeni. Pędy tych roślin były najkrótsze i miały najmniej węzłów.

6. Ważną właściwością młodych roślin stewii była zdolność do szybkiej aklimatyzacji, czterotygodniowy proces hartowania przeżyło 92,5% sadzonek.

#### PIŚMIENNICTWO

Ahmed M.B., Salihin M., Karim R., Razvy M. A., Hannan M. M., Sultana R., Hossain M., Islam R., 2007. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced plant *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. Am-Euras. J. Sci. Res. 2(2), 121–125.

- Anbazhagan M., Kalpana M., Rajendran R., Natarajan V., Dhanavel D., 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emir. J. Food Agric. 22(3), 216–222.
- Bach A., Pawłowska B., 2009. Procesy rozwojowe w kulturze *in vitro* i typy kultury. W: S. Malepszy (red.), Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa, 21–40.
- Benford D.J., DiNovi M., Schlatter J., 2006. Safety evaluation of certain food additives: Steviol glycosides.. WHO Food Addit. Ser. 5, 117–144.
- Brandle J.E., Starratt A.N., Gijzen M., 1998. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological and chemical properties. Can. J. Plant Sci. 78, 527–536.
- Cardello H.M.A.B., Dasilva M.A.P.A., Damasio M.H., 1999. Measurement of the relative sweetness of Stevia extract. Aspartame and Cyclamate/Saccharin compared to Sucrose at different concentrations. Plant Foods Hum. Nutr. 54, 119–130.
- Carneiro J.W.P., Muniz A.S., Guedes T.A., 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) bertoni. Can. J. Plant Sci. 77, 473–474.
- Das A., Gantait S., Mandal N., 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Agric. Res. 6(1), 40–48.
- Debnath M., 2008. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. J. Med. Plant. Res. 2, 045–051.
- Felippe G.M., Lucas N.M.C., Behar L., Oliveira M.A.C., 1971. Observacoes a respeito de germinaco de *Stevia rebaudiana* Bert. Hoehnea 1, 81–93.
- Genus J.M.C., 2003. Molecules of interest, Stevioside. Phytochemistry 64, 913–921.
- Huxtable R.J., 2002. Pharmacology and toxicology of stevioside, rebaudioside A, and steviol. In: A.D. Kinghorn (ed.). Stevia. The genus Stevia. Med. Aromat. Plants Ind. Profiles 19, 161–177.
- Jagatheeswari D., Ranganathan P., 2012. Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Pharm.. Biol. Archiv. 3(2), 315–320.
- Kennelly E.J., 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. Bertoni. In: A.D. Kinghorn (ed.), Stevia. The genus Stevia. Med. Aromat. Plants. Ind. Profiles 19, 68–85.
- Laribi B., Rouatbi N., Kouki K., Bettaieb T., 2012. *In vitro* propagation of (*Stevia rebaudiana* Bert.). A non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. Int. J. Med. Arom. Plants 2 (2), 333–339.
- Larkin P.J., Scowcroft W.R., 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60, 197–214.
- Lemus-Mondaca R., Vega-Galez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K., 2012. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem. 132, 1121–1132.
- Liu J., Li S.F.Y., 1995. Separation and determination of stevia sweeteners by capillary electroforesis and high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr. 18(9), 1703–1719.
- Matsukubo T., 2006. Socrose substitutes and their role in caries prevention. Int. Dent. J. SCN 56(3), 119–130.
- Megaji N.W., Kumar J.K., Singh V., Kaul V.K., Ahuja P.S., 2005. Introducing *Stevia Rebaudiana* a natural zero-calorie sweeteners. Curr. Cell Sci. 88(5), 801–804.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473–497.
- Nakamura S., Tamura Y., 1985. Variation in the main glycosides of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Jpn J. Trop. Agric. 29, 109–116).
- Oktaba W., 2000. Metody statystyki matematycznej w doświadczalnictwie. Wyd. 5, Wyd. AR w Lublinie, 15–23, 35–47.
- Rafiq M., Dahot M.U., Mangrio S.M., Naqvi H.A., Qarshi I.A., 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pak. J. Bot. 39(7), 2467–2474.

- Sakaguchi M., Kan T., 1982. Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) and stevioside. Ci Cult. 34, 235–248.
- Savita S.M., Shella K., Sunanda S., Shankar A.G., Ramakrishna P. 2004. *Stevia rebaudiana* – a functional component for food industry. J. Human Ecol. 15, 261–264.
- Soejarto D.D., 2002. Ethnobotany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In: A.D. Kinghorn (ed.), *Stevia. The genus Stevia*. Med. Aromat. Plants Ind. Profiles 19, 40–67.
- Starratt A.N., Kirby C.W., Posca R., Brandle J.E., 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 59, 367.
- Thiyagarajan P., Venkatachalam P., 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. Indus. Crops Prod. 37, 111–117.
- Verma S., Yadav K., Singh N., 2011. Optimization of the protocols for surface sterilization, regeneration and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci. 11(2), 221–227.
- Yang Y., Hsing Y., Chang W., 1981. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through axillary shoot proliferation *in vitro*. Bot. Bull. Acad. Sin. 22, 57–62.

**Abbreviations:** BAP: 6-benzylaminopurine, GA<sub>3</sub>: gibberellic acid, 2iP: 2-isopentyladenine, IAA: indole-3-acetic acid, IBA: indole-3-butyric acid, KIN: kinetin, NAA: 1-naftalenoacetic acid

**Summary.** The main aim of the study was to assess the capacity of *Stevia rebaudiana* population for micropropagation through node explants. Primary explants were shoots apex collected from plants growing in glasshouse. Node explants were excised from sterile plants developed *in vitro*. They were placed on MS medium supplemented with different BAP concentrations (0.5–4 mg dm<sup>-3</sup>). After 3 weeks, explants were transferred onto the fresh medium with the same BAP concentrations and 0.1 mg dm<sup>-3</sup> GA<sub>3</sub>. Within another 3 weeks each node explants regenerated shoots. The maximum shoots formation (11.36 shoots per explant) was observed on the medium containing 1.0 mg dm<sup>-3</sup> BAP and 0.1 mg dm<sup>-3</sup> GA<sub>3</sub>. Each of the BAP and GA<sub>3</sub> combinations produced much callus. The maximum callus proliferation was found on MS medium containing 1.0 mg dm<sup>-3</sup> BAP. *In vitro* regenerated shoots were rooted in MS medium supplemented with various concentrations of IBA (0.25–1.5 mg dm<sup>-3</sup>). Within 5 weeks each shot produced roots. The maximum root number (10.04) was obtained at 1.0 mg dm<sup>-3</sup> IBA. Forty seedlings were moved into the pots filled with sterile soil mixture and subjected to the hardening process. 92.5% of the plants survived acclimatization.

**Key words:** *Stevia rebaudiana*, micropropagation, node explants