

Разработка методики размножения стевии на основе *in vitro*

А. В. Федоров¹, А. Р. Филиппова¹✉, Т. Г. Леконцева¹

¹ Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Ижевск, Россия

✉ E-mail: albinafil@udman.ru

Аннотация. Цель исследования – разработка технологии производства посадочного материала стевии на основе метода клонального микроразмножения и применения оксида кремния на этапе адаптации, оценка эффективности влияния оксида кремния при адаптации микрорастений. **Методы.** Были применены общепринятые в практике клонального микроразмножения растений методы: стерилизация исходного материала, введение в культуру *in vitro*, собственно клональное микроразмножение, укоренение с последующей адаптацией к условиям окружающей среды. Объектом исследования была стевия: на этапе введения в стерильную культуру – семена, на последующих этапах – микрочеренки и микрорастения. На этапе адаптации был применен оксид кремния в виде раствора ортофосфорной кислоты в концентрации 0,01 %. **Научная новизна.** Показана возможность получения микрорастений на этапе собственно микроразмножения, минуя этап укоренения. На среде MS с эпином 0,1 мг/л в сочетании с индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) 0,5 мг/л развиваются качественные растения небольших размеров: длина побега в среднем 5,6 см, хорошо сформированные развернутые листья и корневая система, относительно короткие междоузлия. **Результаты.** На этапе собственно микроразмножения максимальный эффект получен при включении в состав питательной среды MS 6-БАП в дозе 0,5 мг/л. Совместное включение в состав сред стимуляторов роста эпина с ИУК и ИМК в среднем способствовало развитию корней на 2,1 балла и 1,8 балла соответственно, что было на уровне контроля – 1,8 балла. На средах с цитокининами корни были выражены слабо (0,3 балла с 6-БАП) или отсутствовали (с кинетином), что явилось существенно худшим результатом по сравнению с контролем. Выход адаптированных микрорастений в весенний период составил 80 %. Однако при летней высадке на адаптацию наблюдалось снижение приживаемости растений. С целью повышения эффективности адаптации нами был использован 0,01 % оксид кремния.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, введение, собственно микроразмножение, укоренение, адаптация, стимуляторы роста, 6-БАП, кинетин, эпин, ИУК, ИМК.

Для цитирования: Федоров А. В., Филиппова А. Р., Леконцева Т. Г. Разработка методики размножения стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) на основе *in vitro* // Аграрный вестник Урала. 2023. № 03 (232). С. 64–77. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-232-03-64-77.

Дата поступления статьи: 16.11.2022, **дата рецензирования:** 09.12.2022, **дата принятия:** 13.01.2023.

Постановка проблемы (Introduction)

Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni) относится к семейству астровые [1, с. 47; 2, с. 38], представляет собой многолетнее травянистое или древесное растение высотой до 60–80 см. Листья содержат сладкое вещество – стевियोид. В чистом виде стевियोид представляет собой белый кристаллический порошок, который в 300 раз слаще сахарозы, низкокалорийный, без признаков токсичности и мутагенности, организмом человека практически не усваивается [3, с. 6; 4, с. 6]. Употребление стевии не только не имеет негативного эффекта на здоровье человека в отличие от синтетических подсластителей, но и оказывает терапевтическое воздействие в отноше-

нии многих болезней [5, с. 289; 6, с. 229; 7, с. 264]. Здоровый образ жизни приобретает все больше сторонников, и люди стремятся использовать то, что дала сама природа, поэтому нарастающая популяризация стевии определяет ее перспективу как независимой пищевой оздоровительной культуры [8, с. 195]. Поэтому стевия может быть использована как сахарозаменитель для людей, страдающих нарушением углеводного обмена, в частности, сахарным диабетом [9, с. 23; 10, с. 261]. Подсластители из экстракта листьев стевии являются полезным и важным инструментом для снижения сахара и калорий, диабета, контроля веса и здорового образа жизни [1, с. 61; 11, с. 38; 12, с. 1186].

Стевия – культура, которая имеет высокий потенциал для возделывания на территории РФ, так как почвенно-климатические условия многих регионов России благоприятны для получения высоких урожаев качественного растительного сырья. Необходимость расширения ее производства в нашей стране диктуется прежде всего спектром свойств, благодаря которым стевия (сухой лист и продукты его переработки) может и должна найти широкое применение в отечественной пищевой промышленности и медицине, как это уже произошло в странах Азии, Америки и Европы. Для повышения рентабельности производства стевии – увеличения урожая биомассы листьев высокого качества – требуется разработка технологии получения рассады высокого качества с хорошим адаптивным потенциалом при минимальных затратах [1, с. 61].

При семенном размножении семена стевии характеризуются низкой всхожестью. Стевия дает семена, но лишь малый процент из них прорастает. При культивировании гораздо более эффективным является вегетативный метод размножения [13, с. 79; 14, с. 30], в особенности в условиях Среднего Предуралья [15, с. 68, 69]. Стевия произрастает в условиях тропического климата Латинской Америки. С целью вегетативного размножения маточные растения на зимний период в Среднем Предуралье необходимо заносить в оранжереи, что представляет определенные трудности [16, с. 261]. В данном случае метод клонального микроразмножения является перспективным способом вегетативного размножения для массового тиражирования растений. Методика микроклонирования позволяет не только увеличить количество посадочного материала, но и создать генотипически однородное и высокопродуктивное потомство [2, с. 51, 53; 17, с. 103; 18, с. 85].

Эксплантом может быть любая часть растения: семена, сегменты стебля и апекса, отрезки корней, части листьев и черешков, сегменты соцветий, лепестков и прочее. В качестве первичного экспланта при клональном микроразмножении стевии *in vitro* исследователи используют семена, сегменты стеблей с двумя пазушными почками, а также изолированные листовые пластинки.

В нашем исследовании выбор и поиск оптимального экспланта при введении в культуру *in vitro* стевии зависел от некоторых факторов:

1) низкая стерильность и жизнеспособность эксплантов. При вегетативном введении есть определенные опасения из-за морфофизиологических особенностей вида, которая характеризуется высокой опушенностью надземной части растения;

2) низкая жизнеспособность семян стевии. Известно, что в природе стевия размножается семенами, но их репродукция требует определенных условий. Трудность работы с семенами состоит и в том, что они очень мелкие и быстро теряют всхожесть.

В связи с этим нами в качестве эксплантов были выбраны семена, так как данный метод позволяет с большей долей вероятности получить стерильную культуру.

Другим не менее важным элементом технологии клонального микроразмножения является этап адаптации, который оказывает существенное влияние на выход и качество рассады. Для повышения эффективности адаптации микрорастений применяются различные препараты, способствующие повышению устойчивости микрорастений к стрессу после условий *in vitro*. В последнее время для повышения устойчивости растений к стрессу возрос интерес к кремнийсодержащим препаратам.

В целом анализ литературных данных показывает, что наблюдается увеличение интереса к кремнию и его роли в жизни растений [19, с. 1]. Соединения кремния давно привлекают ученых-аграриев. Большой интерес вызывают соединения, которые можно использовать для обработки семенного материала или внекорневых подкормок растений в связи с высокой эффективностью и экономичностью этих приемов. Это относится и к соединениям кремния, особенно в легкодоступных для растений формах, в частности, водорастворимой. Применение таких соединений способствует улучшению роста и развития растений, повышению качества продукции, увеличению продуктивности [20, с. 156; 21, с. 91]. Кремний является вторым после кислорода распространенным элементом в коре земного шара. Однако наблюдается несоответствие между распространением данного элемента в природе и имеющимися знаниями о нем. Он присутствует во всех пищевых продуктах растительного происхождения [22, с. 302]. Содержание кремния в растениях колеблется от 0,02 до 0,15 %, а наиболее богатые кремнием растения накапливают его до 5 % [23, с. 280].

Кремний способствует увеличению устойчивости растительного организма к биогенным и абиогенным неблагоприятным факторам с использованием механического, физиологического, химического и биохимического уровня защиты. При этом положительный эффект кремния особенно заметен у растений в стрессовых условиях. Кремний придает растениям механическую прочность, укрепляет стенки клеток, обеспечивая жесткость различных органов растения. Оптимизация кремниевого питания растений приводит к увеличению площади листьев. В таких условиях у растений формируются более прочные клеточные стенки, в результате чего снижается опасность полегания посевов, а также поражения их болезнями и вредителями. Одной из важных функций активных форм кремния является стимуляция развития корневой системы. Установлено, что оптимизация кремниевого питания повышает эффективность фотосинтеза и активность корневой системы [19, с. 5, 27].

Без кремния растения более склонны к нарушениям роста, развития и размножения. Это единственный питательный элемент, который не нарушает состояние растений при его избытке [24, с. 86].

До сих пор ученые продолжают искать ответ на вопрос, какие соединения кремния, при каком способе обработки и в каких дозах наиболее эффективно применять на тех или иных культурах. Поэтому исследования по изучению влияния соединений кремния на рост и продуктивность сельскохозяйственных культур не теряют своей актуальности, в особенности в связи с открывшимися возможностями получения препаратов на основе механической активации оксида кремния.

Методология и методы исследования (Methods)

Были применены общепринятые в практике клонального микроразмножения растений методы: стерилизация исходного материала, введение в культуру, собственно клональное микроразмножение, укоренение *in vitro* с последующей адаптацией к условиям окружающей среды [25, с. 55]. Объектом исследования была стевия: на этапе введения в стерильную культуру – семена, на последующих этапах – микрочеренки и микрорастения.

В ходе исследований были использованы питательные среды по рецептуре Мурасиге – Скуга [26] и Кворина – Лепуавра [27]. Среда дополнена стимуляторами роста: цитокининами (кинетин, 6-БАП), ауксинами (ИУК, ИМК) и эпином.

Среды MS и GL следующего состава: макро-, микроэлементы и Fe-хелат по MS и GL соответственно, мезоинозит – 100,0 г/л, глицин – 4,0, никотиновая кислота, тиамин, пиридоксин – по 0,5 мг/л, аскорбиновая кислота – 1,0 мг/л, сахароза – 25,0, агар-агар – 4,2 г/л, pH 5,6–5,8.

Культивирование проводили в биологических пробирках (ПБ2-21-200) на агаризованной питательной среде в светоконнате освещенностью 3 клк при температуре 25 ± 2 °C, фотопериод – 16 часов. Продолжительность каждого субкультивирования составляла 30–45 суток.

Нами был применен семенной метод введения в стерильную культуру. На этапе введения в стерильную культуру для удаления поверхностной загрязненности семена в течение 30 минут промывали под проточной водой. Стерилизацию проводили в условиях ламинар-бокса в перекиси водорода (33 %) в течение 8–10 минут с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

Анализировали не менее 20–30 объектов опыта. Статистическая обработка полученных данных была проведена дисперсионным методом по Б. А. Доспехову [28]. Учитывали следующие параметры: длина микропобегов (см) и микрорастений (см), количество листьев (шт.), коэффициент размножения (шт/чер). Корневую систему оценивали

по четырехбалльной шкале, от 0 до 3 баллов: 0 баллов – корни отсутствуют, 1 балл – корни развиты слабо, 2 и 3 балла – средне- и хорошо развитая корневая система соответственно [29, с. 56]. Успешность адаптации рассматривали как процентное соотношение адаптированных микрорастений к общему количеству высаженных в субстрат (%).

Оксид кремния для исследований был предоставлен Отделом физики и химии наноматериалов Физико-технического института УдмФИЦ УрО РАН.

Оксид кремния использовали концентрации 0,01 % в виде раствора ортофосфорной кислоты.

Оценку влияния оксида кремния (SiO_2) проводили на адаптируемых микрорастениях стевии при поливе и некорневых обработках.

Схема опыта: 1) вода дистиллированная (контроль); 2) полив SiO_2 однократный; 3) полив SiO_2 двукратный; 4) полив SiO_2 трехкратный; 5) опрыскивание SiO_2 однократное; 6) опрыскивание SiO_2 двукратное; 7) опрыскивание SiO_2 трехкратное. Полив и опрыскивание SiO_2 проводили через каждые 7 дней.

Результаты (Results)

На этапе введения в стерильную культуру отмечена высокая инфицированность семян (около 70 %) и их низкая всхожесть (10 %), что можно объяснить особенностью строения семян и биологией вида [30, с. 19]. С целью исключения разнородности генотипа растений для исследований было использовано потомство одного семени.

На этапе собственно микроразмножения для получения максимального количества микрочеренков были использованы две базовые питательные среды (MS, GL), дополненные стимуляторами роста. При культивировании была отмечена частичная гибель микрочеренков. В среднем на среде по рецептуре MS развилось 84,8 % микрочеренков, на GL – 62,4 %. Приживаемость микрочеренков стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста показана на рис. 1.

На безгормональных средах (б/г) MS и GL и MS с 6-БАП (0,5 мг/л) гибели микрочеренков не отмечено, применение других стимуляторов роста способствовало снижению приживаемости и последующего развития микрочеренков. При совместном применении эпина с ИУК и ИМК, с кинетином в среднем на двух средах прижилось 59,0 %, 62,5 % и 65,5 % микрочеренков соответственно, что оказались существенно низкими показателями по сравнению с безгормональным контролем ($\text{HCP}_{05} = 4,72$).

В среднем на средах MS и GL коэффициент размножения 3,6 шт. чер и 2,4 шт. чер соответственно, однако разница недостоверная ($F_{\phi} < F_{05}$). Среда по рецептуре MS характеризуется как богатая, с высоким содержанием аммонийного и нитратного форм

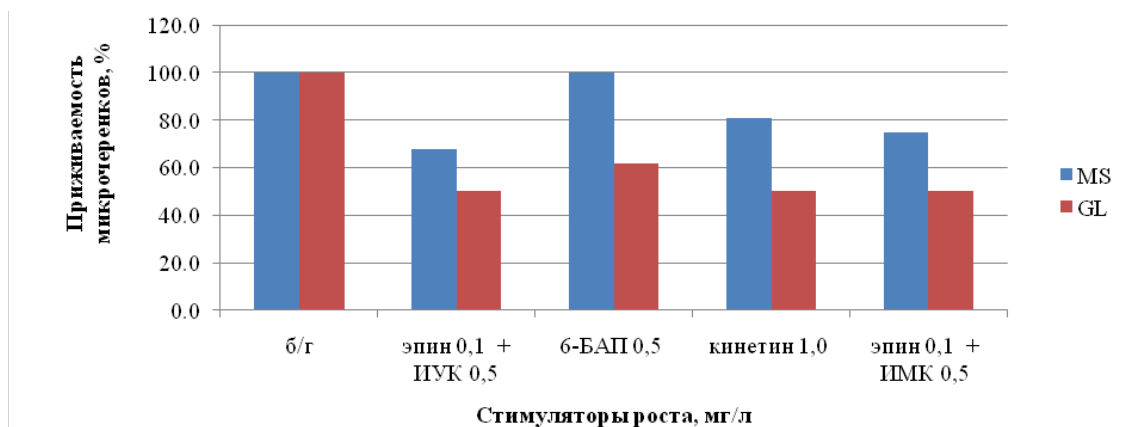


Рис. 1. Приживаемость микрочеренков стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста

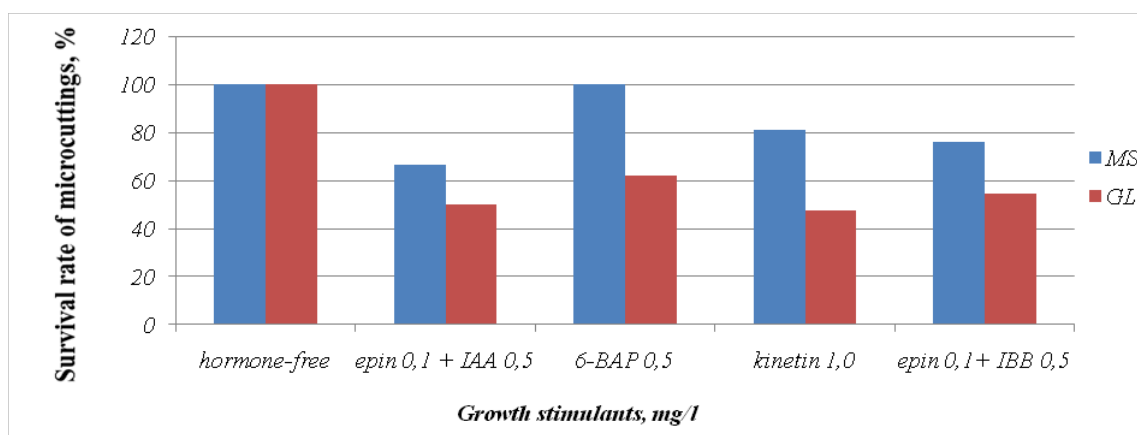


Fig. 1. Survival rate of stevia microcuttings depending on from the nutrient medium and growth stimulants



Рис. 2. Внешний вид растений стевии на питательных средах MS со стимуляторами роста, продолжительность культивирования 43 сут.:

1) безгормональная, 2) эпин 0,1 мг/л + ИУК 0,5 мг/л, 3) 6-БАП 0,5 мг/л, 4) кинетин 1,0 мг/л, 5) эпин 0,1 мг/л + ИМК 0,5 мг/л

Fig. 2. The appearance of stevia plants on MS nutrient media with growth stimulants, cultivation duration 43 days:
1) hormone-free, 2) epin 0,1 + IAA 0,5 mg/l, 3) 6-BAП 0,5 mg/l, 4) kinetin 1,0 mg/l, 5) epin 0,1 + IBA 0,5 mg/l

азота, что, очевидно, положительно сказывается на эффективности микроразмножения стевии. На этапе микроразмножения целесообразно применять среду MS [30, с. 19; 31, с. 74; 32, с. 15].

Из примененных стимуляторов роста лучшим оказался 6-БАП, коэффициент размножения был 4,8 шт/чер, что больше по сравнению с безгормональным контролем на 1,3 шт/чер, однако разница недостоверна ($F_{\phi} < F_{05}$). При использовании в со-

ставе питательной среды эпина совместно с ИУК и ИМК коэффициент размножения был на уровне контроля (3,3 и 3,7 шт/чер соответственно). Кинетин в исследуемой концентрации включать в состав сред также нецелесообразно (таблица 1).

Максимальная длина побега и количество листьев также были на среде с 6-БАП – 7,3 см и 18,3 шт. соответственно, что больше по сравнению с контролем на 0,4 см и 4,7 шт., однако разница недостоверна ($F_{\phi} < F_{05}$, таблицы 2, 3, рис. 2, 3).

Таблица 1
Коэффициент размножения стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста, шт/чер

Питательная среда, фактор А	Стимуляторы роста, мг/л, фактор В					Среднее
	Без гормонов (κ)	Эпин 0,1 + ИУК 0,5	6-БАП 0,5	Кинетин 1,0	Эпин 0,1+ ИМК 0,5	
MS (κ)	3,5	3,3	4,8	2,9	3,7	3,6
QL	2,8	2,4	3,2	2,2	1,5	2,4
Среднее	3,2	2,9	4,0	2,6	2,6	
HCP ₀₅	$F_{\phi} < F_{05}$					

Table 1
The multiplication factor of stevia depending on the nutrient medium and growth stimulants, pcs/stalk

Nutrient medium, factor A	Growth stimulants, mg/l, factor B					Average
	Hormone-free (c)	Epin 0.1 + IAA 0.5	6-BAP 0.5	Kinetin 1.0	Epin 0.1+ IBA 0.5	
MS (c)	3.5	3.3	4.8	2.9	3.7	3.6
QL	2.8	2.4	3.2	2.2	1.5	2.4
Average	3.2	2.9	4.0	2.6	2.6	
LSD ₀₅	$F < F_{05}$					

Таблица 2
Длина побега стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста, см

Питательная среда, фактор А	Стимуляторы роста, мг/л, фактор В					Среднее
	Без гормонов (κ)	Эпин 0,1 + ИУК 0,5	6-БАП 0,5	Кинетин 1,0	Эпин 0,1+ ИМК 0,5	
MS	6,9	5,6	7,3	5,9	7,0	6,5
QL	5,4	4,8	4,6	2,3	2,8	4,0
Среднее	6,2	5,2	6,0	4,1		
HCP ₀₅	$F_{\phi} < F_{05}$					

Table 2
Stevia shoot length depending on the nutrient medium and growth stimulants, cm

Nutrient medium, factor A	Growth stimulants, mg/l, factor B					Average
	Hormone-free (c)	Epin 0.1 + IAA 0.5	6-BAP 0.5	Kinetin 1.0	Epin 0.1+ IBA 0.5	
MS	6.9	5.6	7.3	5.9	7.0	6.5
QL	5.4	4.8	4.6	2.3	2.8	4.0
Average	6.2	5.2	6.0	4.1		
LSD ₀₅	$F < F_{05}$					

На всех питательных средах, включая и без-гормональную, наблюдалось корнеобразование. Очевидно, это стало возможным вследствие эндогенного синтеза ауксинов микропобегами, относительно невысокой концентрации цитокининов и длительного культивирования *in vitro*. В контрольном безгормональном варианте среды было отмечено развитие тонких длинных корней [33, с. 107]. На других средах корневая система микрорастений была развита лучше, однако присутствовал крупный каллус, диаметр которого достигал 10–15 мм. На средах с кинетином в толще питательной среды был сформирован только каллус без развития корневой системы. В ходе проведения исследований было выявлено образование воздушных корней у

микрорастений выше уровня питательной среды в нижней части побегов независимо от состава среды (рис. 4).

Таким образом, на этапе собственно микроразмножения максимальный коэффициент размножения был получен при включении в состав питательной среды MS 6-БАП в дозе 0,5 мг/л (4,8 шт/чер), что подтверждается исследованиями других авторов [32, с. 14]. Выявленное на данном этапе корнеобразование побегов позволяет получить жизнеспособные микрорастения для последующей высадки на адаптацию, минуя этап укоренения, благодаря чему снизится стоимость затрат при производстве расады.

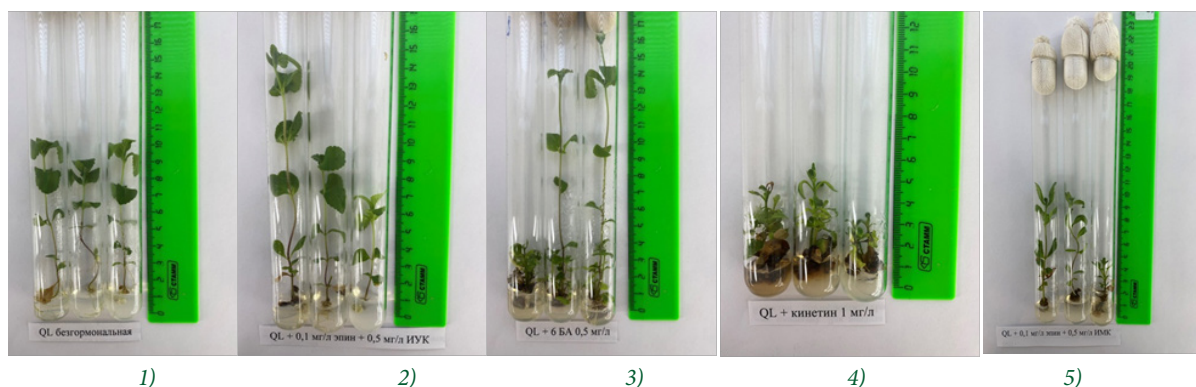


Рис. 3. Внешний вид растений стевии на питательных средах QL со стимуляторами роста, продолжительность культивирования 43 сут.:

1) безгормональная, 2) эпин 0,1 мг/л + ИУК 0,5 мг/л, 3) 6-БАП 0,5 мг/л, 4) кинетин 1,0 мг/л, 5) эпин 0,1 мг/л + ИМК 0,5 мг/л
 Fig. 3. The appearance of stevia plants on QL nutrient media with growth stimulators, cultivation duration 43 days:
 1) hormone-free, 2) epin 0,1 + IAA 0,5 mg/l, 3) 6-BAP 0,5 mg/l, 4) kinetin 1,0 mg/l, 5) epin 0,1 mg/l + IBA 0,5 mg/l



Рис. 4. Внешний вид воздушных корней на микрорастениях на средах Мурашиге – Скуга с кинетином 1 мг/л (слева) и 6-бензиламинопурином 0,5 мг/л (справа), культивирование в течение 43 сут.

Fig. 4. Appearance of aerial roots on microplants on Murashige-Skoog media with kinetin 1 mg/l (left) and 6-benzylaminopurine 0.5 mg/l (right), cultivation duration 43 days

Таблица 3
 Количество листьев микрорастений стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста, шт.

Питательная среда, фактор А	Стимуляторы роста, мг/л, фактор В					Среднее
	Без гормонов (к)	Эпин 0,1 + ИУК 0,5	6-БАП 0,5	Кинетин 1,0	Эпин 0,1+ ИМК 0,5	
MS	13,6	12,9	18,3	14,4	13,9	14,6
QL	11,1	11,6	13,1	11,7	7,9	11,1
Среднее	12,4	12,3	15,7	13,1	10,9	
HCP ₀₅	$F_{\phi} < F_{05}$					

Table 3
 The number of leaves of stevia microplants depending on the nutrient medium and growth stimulants, pcs

Nutrient medium, factor A	Growth stimulants, mg/l, factor B					Average
	Hormone-free (c)	Epin 0.1 + IAA 0.5	6-BAP 0.5	Kinetin 1.0	Epin 0.1+ IBA 0.5	
MS	13.6	12.9	18.3	14.4	13.9	14.6
QL	11.1	11.6	13.1	11.7	7.9	11.1
Average	12.4	12.3	15.7	13.1	10.9	
LSD ₀₅	$F < F_{05}$					

Таблица 4
Качество корнеобразования побегов стевии в зависимости от питательной среды и стимуляторов роста, в баллах

Питательная среда, фактор А		Стимуляторы роста, мг/л, фактор В					Среднее
		Без добавок (к)	Эпин 0,1 + ИУК 0,5	6-БАП 0,5	Кинетин 1,0	Эпин 0,1+ ИМК 0,5	
MS (к)		1,7	2,0	0,3	0,0	2,5	1,3
QL		1,9	2,1	0,3	0,0	1,0	1,1
Среднее		1,8	2,1	0,3	0,0	1,8	
НСР ₀₅	Частных различий	2,6					
	По фактору А	1,9					
	По фактору В	0,6					

Table 4
The quality of root formation of stevia shoots depending on the nutrient medium and growth stimulants, in points

Nutrient medium, factor A		Growth stimulants, mg/l, factor B					Average
		Without additives (c)	Epin 0.1 + IAA 0.5	6-BAP 0.5	Kinetin 1.0	Epin 0.1+ IBA 0.5	
MS (c)		1.7	2.0	0.3	0.0	2.5	1.3
QL		1.9	2.1	0.3	0.0	1.0	1.1
Average		1.8	2.1	0.3	0.0	1.8	
LSD ₀₅	Private differences	2.6					
	By factor A	1.9					
	By factor B	0.6					

В ходе оценки качества микрорастений для высадки на адаптацию лучшей оказалась среда MS с добавлением эпина 0,1 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л и с ИМК 0,5 мг/л, на которых развивались качественные растения небольших размеров: длина побега – 5,6 и 7,0 см, с хорошо развитыми листьями (12,9 и 13,9 шт.) и корнями (2,0 и 2,5 балла соответственно) (рис. 2, фото 2; 5). Следует отметить, что длинный побег при высадке на адаптацию падает, погибает, что представляет определенные трудности при уходе и последующей приживаемости микрорастений.

Состав питательных сред MS и QL не оказал существенного влияния на корнеобразование. Включение в состав сред стимуляторов роста эпина с ИУК и ИМК в среднем способствовали развитию корней на 2,1 и 1,8 балла соответственно, что было на уровне контроля – 1,8 балла. На средах с цитокининами корни были выражены слабо (0,3 балла с 6-БАП) или отсутствовали (с кинетином), что явилось существенно худшим результатом (таблица 4).

На безгормональной питательной среде развивались длинные тонкие корни. Совместное применение ауксинов ИУК и ИМК с эпином усиливало корнеобразование. Эпин-экстра является природным стимулятором, действующее вещество – 24-эпибрассинолид, вызывающий широкий спектр ответов растительной клетки, включая рост растений, активизацию фотосинтеза, усиление фиксации азота, адаптоген с ярко выраженным антистрессовым

действием солевому стрессу [34, с. 57]. Цитокинины по своему влиянию на растительные организмы являются антагонистами ауксинов и способствуют росту и развитию надземной части растений. Цитокинины не только стимулируют клеточное деление, но и могут изменять строение растительных клеток, выращиваемых в культуре. Цитокинины также повышают устойчивость клеток к самым различным неблагоприятным воздействиям [34, с. 20].

Адаптация проводилась в пластиковых одно-разовых контейнерах объемом 0,5 л на торфяном питательном субстрате, изготовленном согласно ТУ 20.12.80-001-41790563-2020, производства ООО «Русская торфяная компания» следующего состава (мг/л): азота (NH₄ + NO₃) – 120, фосфора (P₂O₅) – 130, калия (K₂O) – 220, pH солевой суспензии – 5,5. Субстрат перед посадкой пролили раствором «Триходерма вериде» (в концентрации 1,5 мл/л). Микрорастения были очищены от нижних листьев, корни промыты от агаризованной питательной среды в децимолярном растворе марганцовокислого калия [35, с. 241]. Для уменьшения транспирации проводили укрытие микрорастений прозрачными пластиковыми контейнерами меньшего объема. Влажность поддерживали путем ежедневного опрыскивания верхнего контейнера водой. По данной методике выход адаптированных растений стевии при весенней посадке в почвогрунт составил 80 %. Однако при летней высадке на адаптацию наблюдалось снижение приживаемости

сти растений. С целью повышения эффективности адаптации нами был использован оксид кремния. В контрольном варианте опыта при поливе и опрыскивании водой приживаемость микрорастений была невысокая и составила 54,2 %. При однократном применении оксида кремния приживаемость по сравнению с контролем повышалась на 8,3 % и 12,5 % соответственно ($HCP_{05} = 9,2$) (таблица 5).

При однократном и двукратном поливе оксидом кремния приживаемость микрорастений была высокой при данном способе применения и составля-

ла 62,5 и 61,4 % соответственно, что выше по сравнению с контролем на 8,3 и 7,2 % соответственно (при $HCP_{05} = 9,2$). При однократном опрыскивании прижилось 66,7 % микрорастений, что явилось существенно лучшим показателем, при двукратном – 55,6 %, при трехкратном приживаемость была самая низкая и составила 25 %.

В ходе экспериментальных исследований также наблюдается влияние оксида кремния на прирост микрорастений стевии в зависимости от способа и количества обработок (рис. 5).

Таблица 5

Влияние оксида кремния на адаптацию микрорастений стевии, 2022 г.

Вариант опыта	Приживаемость, %
H ₂ O (контроль)	54,2
Полив SiO ₂ однократный	62,5
Полив SiO ₂ двукратный	61,4
Полив SiO ₂ трехкратный	55,6
Опрыскивание SiO ₂ однократное	66,7
Опрыскивание SiO ₂ двукратное	55,6
Опрыскивание SiO ₂ трехкратное	25,0
HCP ₀₅	9,2

Table 5

The effect of silicon oxide on the adaptation of stevia microplants, 2022

Experience variant	Survival rate, %
H ₂ O (control)	54.2
Watering SiO ₂ once	62.5
Watering SiO ₂ twice	61.4
Watering SiO ₂ three times	55.6
Spraying SiO ₂ once	66.7
Spraying SiO ₂ twice	55.6
Spraying SiO ₂ three times	25.0
LSD ₀₅	9.2

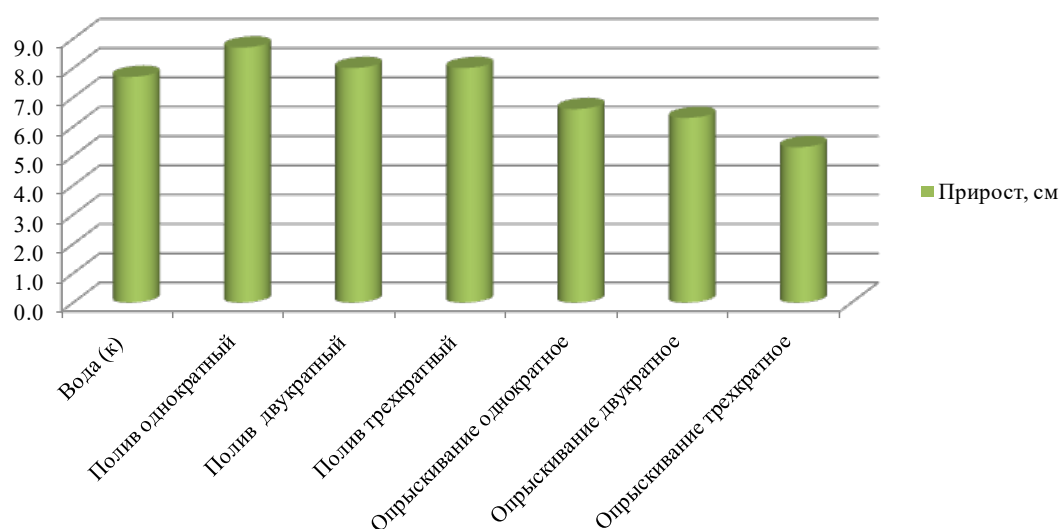


Рис. 5. Прирост микрорастений стевии при поливе и опрыскивании оксидом кремния

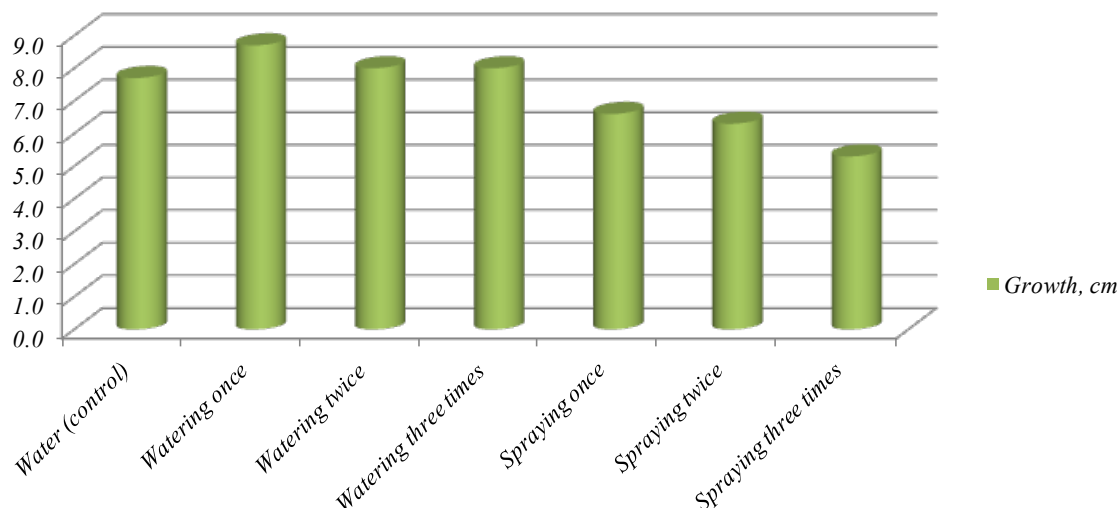


Fig. 5. The growth of stevia microplants during irrigation and spraying silicon oxide

По сравнению с контролем прирост микрорастений стевии при однократном поливе оксидом кремния был выше, чем при опрыскивании, однако разница недостоверна ($F_{\phi} < F_{05}$). Увеличение кратности применения оксида кремния привело к уменьшению прироста микрорастений как при поливе, так и при опрыскивании. Положительные результаты получены при однократном поливе и опрыскивании оксидом кремния микрорастений стевии. Согласно данным В. В. Матыченкова, при корневом применении усваивается 1–5 % кремния, а при некорневом – до 40 % [19, с. 12]. Таким образом, повышение кратности применения оксида кремния на микрорастения стевии имело отрицательное влияние.

Итак, в результате проведенных исследований и анализа результатов можно отметить, что получены новые знания по особенностям роста и развития микрорастений стевии, их реакции на применяемые разные прописи питательных сред и стимуляторы роста, которые вносят вклад в теорию размножения растений *in vitro*. Усовершенствованные элементы технологии клонального микроразмножения стевии применимы в практике размножения и производства посадочного материала стевии.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

1. Было выявлено, что среда MS по сравнению с QL является лучшей для развития микрочеренков, отмечено улучшение таких показателей, как коэффициент размножения (3,6 и 2,4 шт/чер), длина

побега (6,5 и 4,0 см) и количество листьев (14,6 и 11,1 шт. соответственно).

2. Из изученных в опытах стимуляторов роста лучшим оказался 6-БАП (0,5 мг/л), получены самые высокие показатели в опыте коэффициента размножения – 4,8 шт/чер, что больше по сравнению с контролем на 1,3 шт/чер, а также длины побега и количества листьев – 7,3 см и 18,3 шт. соответственно, что больше по сравнению с контролем на 0,4 см и 4,7 шт.

3. На этапе собственно микроразмножения выявлена возможность получения стандартных микрорастений для последующей высадки на адаптацию, минуя этап укоренения, что позволяет повысить эффективность методики клонального микроразмножения.

4. Среда MS с эпином 0,1 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л и ИМК 0,5 мг/л является лучшей для получения растений высокого качества с меньшим габитусом, которые более технологичны для высадки на адаптацию: длина побега 5,6 и 7,0 см, с хорошо развитыми листьями (12,9 и 13,9 шт.) и корнями (2,0 и 2,5 балла соответственно).

5. Однократное применение оксида кремния на этапе адаптации растений стевии путем однократного полива или опрыскивания способствует повышению эффективности адаптации. Увеличение частоты применения оксида кремния снижало приживаемость микрорастений.

Библиографический список

1. Синявина Н. Г., Кочетов А. А., Егорова К. В. Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Биологические особенности и факторы, влияющие на рост растений и накопление сладких гликозидов // Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки». 2022. Т. 164. Кн. 1. С. 46–75. DOI: 10.26907/2542-064x.2022.1.
2. Angelini L. G., Martini A., Passera B., Tavarini S. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and associated challenges // Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry / Ed. by J. M. Mérillon, K. Ramawat. Springer Cham, 2018. Pt. 1. Pp. 35–85. DOI: 10.1007/978-3-319-27027-2_8.

3. Кочетов А. А., Синявина Н. Г. Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni): биохимический состав, терапевтические свойства и использование в пищевой промышленности (обзор) // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 5–27. DOI:10.14258/jcprm.2021027931.
4. Шульгина А. А. Зависимость морфофизиологических показателей от условий выращивания *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro и in vivo: автореферат дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2020. 22 с.
5. Khan S. A., Verma P., Rahman L. U., Parasharami V. A. Exploration of biotechnological studies in low-calorie sweetener *Stevia rebaudiana*: Present and future prospects: Ch. 13 // Medicinal and Aromatic Plants. Expanding Their Horizons through Omics / Ed. By T. Aftab, K. R. Hakeem. Acad. Press, 2021. Pp. 289–324. DOI: 10.1016/B978-0-12-819590-1.00013-6.
6. Singh D. P., Kumari M., Prakash H. G., Rao G. P., Solomon S. Phytochemical and pharmacological importance of stevia: A calorie-free natural sweetener // Sugar Tech. 2019. Vol. 21. No 2. Pp. 227–234. DOI: 10.1007/s12355-019-00704-1.
7. Wang J., Zhao H., Wang Y., Lau H., Zhou W., Chen C., Tan S. A review of stevia as a potential healthcare product: Up-to-date functional characteristics, administrative standards and engineering techniques // Trends in Food Science & Technology. 2020. Vol. 103. Pp. 264–281. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.07.023.
8. Маховикова Т. Ф., Сивцева С. Н., Рыбашлыкова Л. П. Интродукция и перспективы выращивания стевии в Западном Прикаспии // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее образование. 2018. № 3 (51). С. 191–196.
9. Трухачев В. И., Стародубцева Г. П., Безгина Ю. А., Любая С. И., Веселова М. В. Перспективы выращивания стевии и производство продукции на ее основе // Вестник АПК Ставрополя. 2012. № 1. С. 22–25.
10. Savita S. M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A. G., Ramakrishna P. *Stevia rebaudiana* – a functional component for food industry // Human Ecology. 2004. Vol. 15. No. 4. Pp. 261–264. DOI: 10.1080/09709274.2004.11905703.
11. Эшпулатов Ш. Я., Тешабоев Н. И., Мамадалиев М. З. Интродукция, свойства и выращивание лекарственного растения стевия в условиях Ферганского долины // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). 2021. Т. 2. № 2. С. 37–41. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2021.2.83.1253.
12. Samuel P., Ayoob K. T., Magnuson B. A., Wölwer-Rieck U., Jeppesen P. B., Rogers P. J., Rowland I., Mathews R. *Stevia* leaf to stevia sweetener: Exploring its science, benefits, and future potential // Journal of Nutrition. 2018. Vol. 148. No. 7. Pp. 1186–1205. DOI: 10.1093/jn/nxy102.
13. Клинг А. П., Кумпан В. Н., Приходько Т. В. Размножение стевии зелеными черенками в условиях южной лесостепи Омской области // Разнообразие и устойчивое развитие агробиоценозов Омского Прииртышья: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной 90-летию ботанического сада Омского ГАУ. Омск, 2017. С. 79–81.
14. Щебарскова З. С., Пучков М. Ю., Исаев К. В. Стевия – ценное лекарственное растение для Нижнего Поволжья // Инновационная наука. 2018. № 2. С. 30–33.
15. Федоров А. В., Филиппова А. Р., Зорин Д. А., Ардашева О. А. Интродукция *Stevia rebaudiana* Bertoni в Среднем Предуралье. Ижевск: Удмуртский ФИЦ УрО РАН, 2020. 94 с.
16. Филиппова А. Р., Федоров А. В. Способы размножения *Stevia rebaudiana* В. при интродукции в Удмуртской Республике // Труды по интродукции и акклиматизации растений. Вып. 1. Ижевск: Удмуртский ФИЦ УрО РАН, 2021. С. 257–262.
17. Дорошенко Н. П., Пузырнова В. Г., Трошин Л. П. Усовершенствование технологии клонального микроразмножения винограда // Виноградарство и виноделие. Магарач. 2022. Т. 24. № 2 (120). С. 102–111.
18. Хроленко Ю. А., Горпенченко Т. Ю., Яцунская М. С., Ромашова М. В., Барсукова Е. Н. Некоторые аспекты адаптации *Stevia rebaudiana* Bertoni в Приморском крае в условиях новой агротехники // Вестник ДВО РАН. 2016. № 2. С. 84–88.
19. Матыченков В. В. Роль подвижных соединений кремния в растениях и системе почва-растение: автореферат дис. ... д-ра биол. наук. Пушино, 2008. 35 с.
20. Ермолаев А. А. Кремний в сельском хозяйстве. Москва: Линф, 1992. 256 с.
21. Сластия И. В. Влияние обработки соединениями кремния семян и вегетирующих растений на продуктивность сортов ярового ячменя // Агробиохимия. 2012. № 10. С. 51–59.
22. Колесников М. П. Формы кремния в растениях // Успехи биологической химии. 2001. № 41. С. 301–332.
23. Матыченков В. В., Бочарникова Е. А., Кособрухов А. А., Биль К. Я. О подвижных формах кремния в растениях // Доклады Академии наук. 2008. Т. 418. № 2. С. 279–281.
24. Самсонова Н. Е. Кремний в растительных и животных организмах // Агробиохимия. 2019. № 1. С. 86–96. DOI: 10.1134/S0002188119010071.
25. Дорошенко Т. Н., Рязанова Л. Г. Биологические основы размножения плодовых растений. Краснодар: КубГАУ, 2015. 136 с.

26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. Pp. 473–497.
27. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus // *Acta Hortic*. 1977. Vol. 78. Pp. 437–442.
28. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва: Колос, 1968. 336 с.
29. Леконцева Т. Г., Федоров А. В. Совершенствование технологии размножения винограда in vitro // *Аграрный вестник Урала*. 2020. № 09 (200). С. 55–62. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-200-9-55-62.
30. Васильченко Е. Н. Микрклональное размножение стевии (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) в условиях in vitro // *Международный журнал «Символ науки»*. 2016. № 6. С. 19–20.
31. Васильченко Е. Н., Колесникова Е. О. Размножение стевии (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) в условиях in vitro // *Аграрная наука – сельскому хозяйству: материалы XII Международной научно-практической конференции*. Екатеринбург, 2017. С. 74–75.
32. Егорова Д. А., Молканова О. И. Оптимизация методики клонального микроразмножения *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Тенденции развития науки и образования*. 2020. С. 13–16. DOI: 10.18411/lj-11-2020-45.
33. Шульгина А. А., Калашникова Е. А., Тараканов И. Г. Зависимость морфогенеза *Stevia rebaudiana* in vitro от факторов различной природы // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 3 (5). С. 105–109. DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-105-109.
34. Котляров Д. В., Котляров В. В., Федулов Ю. П. Физиологически активные вещества в агротехнологиях. Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, 2016. 224 с.
35. Леконцева Т. Г., Худякова А. В., Исаева А. Н., Федоров А. В. Оптимизация некоторых этапов микроклонального размножения чайно-гибридной розы сорта Анжелика // *Вестник Пермского университета. Серия «Биология»*. 2017. № 3. С. 240–244.

Об авторах:

Александр Владимирович Федоров¹, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, ORCID 0000-0003-2759-2037, AuthorID 219069; +7 950 820-25-65, oiar@udman.ru

Альбина Равилевна Филиппова¹, младший научный сотрудник, ORCID 0000-0001-8470-8820, AuthorID 825076; +7 963549-93-77, albinafil@udman.ru

Татьяна Германовна Леконцева¹, научный сотрудник, ORCID 0000-0002-6659-0504, AuthorID 637255; +7 950 155-20-26, t.lekontseva@yandex.ru

¹Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Ижевск, Россия

Development of a method for propagating stevia based on *in vitro*

A. V. Fedorov¹, A. R. Filippova¹✉, T. G. Lekontseva¹

¹Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia

✉E-mail: albinafil@udman.ru

Abstract. The purpose of the study is to develop a technology for the production of stevia planting material based on the method of clonal micropropagation and the use of silicon oxide at the stage of adaptation, evaluation of the effectiveness of the influence of silicon oxide in the adaptation of microplants. **Methods.** Commonly used in the practice of clonal micropropagation of plants were applied. Methods generally accepted in the practice of clonal micropropagation of plants were applied: sterilization of the initial material, introduction into culture *in vitro*, clonal micropropagation proper, rooting with subsequent adaptation to environmental conditions. The object of the study was stevia: at the stage of introduction into a sterile culture – seeds, at subsequent stages – microcuttings and microplants. At the adaptation stage, silicon oxide was used in the form of a solution of orthophosphoric acid at a concentration of 0.01%. **Scientific novelty.** The possibility of obtaining microplants at the stage of micropropagation itself, bypassing the stage of rooting, is shown. On the MS medium with epin 0.1 mg/l in combination with indolyl-3-acetic acid (IAA) 0.5 mg/l, high-quality plants of small sizes develop: shoot length on average 5.6 cm, well-formed unfolded leaves and root system, relatively short internodes. **Research results.** At the stage of introduction into a sterile culture during sterilization with a 33 % hydrogen peroxide solution in an exposure of 8–10 minutes, a high infection of seeds (about 70 %) and their low germination (10 %) were noted, which can be

explained by the structure of the seeds and the biology of the species. At the stage of micropropagation itself, the maximum effect was obtained when MS 6-BAP was included in the nutrient medium at a dose of 0.5 mg/l. The combined inclusion of epin growth stimulants with IAA and IMA in the composition of the media contributed to the development of roots by 2.1 points and 1.8 points, respectively, which was at the control level – 1.8 points. On media with cytokinins, the roots were weakly expressed (0.3 points with 6-BAP) or absent (with kinetin), which was a significantly worse result compared to the control. The output of adapted microdenies in the spring amounted to 80 %. However, during the summer landing for adaptation, a decrease in the survival rate of plants was observed. In order to increase the efficiency of adaptation, we used 0.01 % silicon oxide.

Keywords: clonal micropropagation, introduction, micropropagation proper, rooting, adaptation, growth stimulants, 6-benzylaminopurine, kinetin, epin, indolyl-3-acetic acid, indolyl-3-butyric acid.

For citation: Fedorov A. V., Filippova A. R., Lekontseva T. G. Razrabotka metodiki razmnzheniya stevii na osnove *in vitro* [Development of a method for propagating stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) based on *in vitro*] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2023. No. 03 (232). Pp. 64–77. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-232-03-64-77. (In Russian.)

Date of paper submission: 16.11.2022, **date of review:** 09.12.2022, **date of acceptance:** 13.01.2023.

References

1. Sinyavina N. G., Kochetov A. A., Egorova K. V. Steviya (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Biologicheskie osobennosti i faktory, vliyayushchie na rost rasteniy i nakoplenie sladkikh glikozidov [Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Biological features and factors affecting plant growth and the accumulation of sweet glycosides] // Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. 2022. T. 164. Kn. 1. Pp. 46–75. DOI: 10.26907/2542-064x.2022.1. (In Russian.)
2. Angelini L. G., Martini A., Passera B., Tavarini S. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and associated challenges // Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry / Ed. by J.M. Mérillon, K. Ramawat. Springer Cham, 2018. Pt. 1. Pp. 35–85. DOI: 10.1007/978-3-319-27027-2_8. (In Russian.)
3. Kochetov A. A., Sinyavina N. G. Steviya (*Stevia rebaudiana* Bertoni): biokhimicheskiy sostav, terapevticheskie svoystva i ispol'zovanie v pishchevoy promyshlennosti (obzor) [Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Biochemical composition, therapeutic properties and use in the food industry (review)] // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2021. No. 2. Pp. 5–27. DOI: 10.14258/jcprm.2021027931. (In Russian.)
4. Shul'gina A. A. Zavisimost' morfofiziologicheskikh pokazateley ot usloviy vyrashchivaniya *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* i *in vivo*: avtoreferat na dis. ... kand. biol. nauk [Dependence of morphophysiological parameters on growing conditions of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* and *in vivo*: abstract of the thesis. ... cand. biol. sciences]. Moscow, 2020. 22 p. (In Russian.)
5. Khan S. A., Verma P., Rahman L. U., Parasharami V. A. Exploration of biotechnological studies in low-calorie sweetener *Stevia rebaudiana*: Present and future prospects: Ch. 13 // Medicinal and Aromatic Plants. Expanding Their Horizons through Omics / Ed. By T. Aftab, K. R. Hakeem. Acad. Press, 2021. Pp. 289–324. DOI: 10.1016/B978-0-12-819590-1.00013-6.
6. Singh D. P., Kumari M., Prakash H. G., Rao G. P., Solomon S. Phytochemical and pharmacological importance of stevia: A calorie-free natural sweetener // Sugar Tech. 2019. Vol. 21. No. 2. Pp. 227–234. DOI: 10.1007/s12355-019-00704-1.
7. Wang J., Zhao H., Wang Y., Lau H., Zhou W., Chen C., Tan S. A review of stevia as a potential healthcare product: Up-to-date functional characteristics, administrative standards and engineering techniques // Trends in Food Science & Technology. 2020. Vol. 103. Pp. 264–281. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.07.023.
8. Makhovikova T. F., Sivtseva S. N., Rybashlykova L. P. Introduktsiya i perspektivy vyrashchivaniya stevii v Zapadnom Prikaspii [Introduction and prospects for growing stevia in the Western Caspian region] // Proceedings of lower volga agro-university complex: science and higher education. 2018. No. 3 (51). Pp. 191–196. (In Russian.)
9. Trukhachev V. I., Starodubtseva G. P., Bezgina Yu. A., Lyubaya S. I., Veselova M. V. Perspektivy vyrashchivaniya stevii i proizvodstvo produktsii na ee osnove [Prospects for the cultivation of stevia and the production of products based on it] // Agricultural Bulletin of Stavropol Region. 2012. No. 1. Pp. 22–25. (In Russian.)
10. Savita S. M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A. G., Ramakrishna P. *Stevia rebaudiana* – a functional component for food industry // j. Human Ecology 2004. Vol. 15. No. 4. Pp. 261–264. DOI: 10.1080/09709274.2004.11905703. (In Russian.)
11. Eshpulatov Sh. Ya., Teshaboev N. I., Mamadaliev M. Z. Introduktsiya, svoystva i vyrashchivanie lekarstvennogo rasteniy steviya v usloviyakh Ferganskogo doliny [Introduction, properties and cultivation of the medicinal

- plant stevia in the conditions of the Ferghana Valley] // Eurasian union of scientists. 2021. Vol. 2. No. 2. Pp. 37–41. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2021.2.83.1253. (In Russian.)
12. Samuel P., Ayoob K. T., Magnuson B. A., Wölwer-Rieck U., Jeppesen P. B., Rogers P. J., Rowland I., Mathews R. *Stevia* leaf to stevia sweetener: Exploring its science, benefits, and future potential // Journal of Nutrition. 2018. Vol. 148. No. 7. Pp. 1186–1205. DOI: 10.1093/jn/nxy102.
 13. Kling A. P., Kumpan V. N., Prikhod'ko T. V. Razmnozhenie stevii zelenymi cherenkami v usloviyakh yuzhnoy lesostepi Omskoy oblasti [Reproduction of stevia by green cuttings in the conditions of the southern forest-steppe of the Omsk region] // Raznoobrazie i ustoychivoe razvitie agrobiotsenozov Omskogo Priirtysh'ya: materialy Natsional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 90-letiyu botanicheskogo sada Omskogo GAU. Omsk, 2017. Pp. 79–81. (In Russian.)
 14. Shchebarskova Z. S., Puchkov M. Yu., Isaev K. V. Steviya – tsennoe lekarstvennoe rastenie dlya Nizhnego Povolzh'ya [Stevia is a valuable medicinal plant for the Lower Volga region] // Innovation science. 2018. No. 2. Pp. 30–33. (In Russian.)
 15. Fedorov A. V., Filippova A. R., Zorin D. A., Ardasheva O. A. Introduktsiya *Stevia rebaudiana* Bertoni v Srednem Predural'e [Introduction of *Stevia rebaudiana* Bertoni in the Middle Urals]. Izhevsk: Udmurtskiy FITs UrO RAN, 2020. 94 p. (In Russian.)
 16. Filippova A. R., Fedorov A. V. Sposoby razmnozheniya *Stevia rebaudiana* B. pri introduktsii v Udmurtskiy Respublike [Breeding methods of *Stevia rebaudiana* B. when introduced in the Udmurt Republic] // Trudy po introduktsii i akklimatizatsii rasteniy. Iss. 1. Izhevsk: Udmurtskiy FITs UrO RAN, 2021. Pp. 257–262. (In Russian.)
 17. Doroshenko N. P., Puzyrnova V. G., Troshin L. P. Uovershenstvovanie tekhnologii klonal'nogo mikrorazmnozheniya vinograda [Improvement of the technology of clonal micropropagation of grapes] // Vinogradarstvo i vinodelie. Magarach. 2022. Vol. 24. No. 2 (120). Pp. 102–111. (In Russian.)
 18. Khrolenko Yu. A., Gorpenchenko T. Yu., Yatsunskaya M. S., Romashova M. V., Barsukova E. N. Nekotorye aspekty adaptatsii *Stevia rebaudiana* Bertoni v Primorskom krae v usloviyakh novoy agrotekhniki [Some aspects of the adaptation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Primorsky Krai under the conditions of new agricultural technology] // Vestnik DVO RAN. 2016. No. 2. Pp. 84–88. (In Russian.)
 19. Matychenkov V. V. Rol' podvizhnykh soedineniy kremniya v rasteniyakh i sisteme pochva-rastenie: avtoreferat diss. ... d-ra boil. nauk [The role of mobile silicon compounds in plants and the soil-plant system: abstract of the dissertation ... doctor of biological sciences]. Pushchino, 2008. 35 p. (In Russian.)
 20. Ermolaev A. A. Kremniy v sel'skom khozyaystve [Silicon in agriculture]. Moscow: Linf, 1992. 256 p. (In Russian.)
 21. Slastyia I. V. Vliyanie obrabotki soedineniyami kremniya semyan i vegetiruyushchikh rasteniy na produktivnost' sortov yarovogo yachmenya [Influence of treatment with silicon compounds of seeds and vegetative plants on the productivity of spring barley varieties] // Agrokhimiya. 2012. No. 10. Pp. 51–59. (In Russian.)
 22. Kolesnikov M. P. Formy kremniya v rasteniyakh [Forms of silicon in plants] // Uspekhi biologicheskoy khimii. 2001. No. 41. Pp. 301–332. (In Russian.)
 23. Matychenkov V. V., Bocharnikova E. A., Kosobryukhov A. A., Bil' K. Ya. O podvizhnykh formakh kremniya v rasteniyakh [On mobile forms of silicon in plants] // Doklady Akademii nauk. 2008. Vol. 418. No. 2. Pp. 279–281. (In Russian.)
 24. Samsonova N. E. Kremniy v rastitel'nykh i zhivotnykh organizmakh [Silicon in plant and animal organisms] // Agrokhimiya. 2019. No. 1. Pp. 86–96. DOI: 10.1134/S0002188119010071. (In Russian.)
 25. Doroshenko T. N., Ryazanova L. G. Biologicheskie osnovy razmnozheniya plodovykh rasteniy [Biological bases of reproduction of fruit plants]. Krasnodar: KubGAU, 2015. 136 p. (In Russian.)
 26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. Pp. 473–497.
 27. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus // Acta Hort. 1977. Vol. 78. Pp. 437–442.
 28. Dospikhov B. A. Metodika polevogo opyta [Methods of field experience]. Moskva: Kolos, 1968. 336 p. (In Russian.)
 29. Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Sovershenstvovanie tekhnologii razmnozheniya vinograda *in vitro* [Improving the technology of reproduction of grapes *in vitro*] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 09 (200). Pp. 55–62. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-200-9-55-62. (In Russian.)
 30. Vasil'chenko E. N. Mikroklonal'noe razmnozhenie stevii (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) v usloviyakh *in vitro* [Micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) *in vitro*] // Symbol of science: international scientific journal. 2016. No. 6. Pp. 19–20. (In Russian.)
 31. Vasil'chenko E. N., Kolesnikova E. O. Razmnozhenie stevii (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) v usloviyakh *in vitro* [Reproduction of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hensl.) *in vitro*] // Agrarnaya nauka – sel'skomu

khozyaystvu: materialy XII Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Ekaterinburg, 2017. Pp. 74–75. (In Russian.)

32. Egorova D. A., Molkanova O. I. Optimizatsiya metodiki klonal'nogo mikrorazmnozheniya *Stevia rebaudiana* Bertoni [Optimization of *Stevia rebaudiana* Bertoni clonal micropropagation technique] // Tendentsii razvitiya nauki i obrazovaniya. 2020. Pp. 13–16. DOI: 10.18411/lj-11-2020-45. (In Russian.)

33. Shul'gina A. A., Kalashnikova E. A., Tarakanov I. G. Zavisimost' morfogeneza *Stevia rebaudiana in vitro* ot faktorov razlichnoy prirody [Dependence of *Stevia rebaudiana* morphogenesis *in vitro* on factors of different nature] // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN. 2018. No. 3 (5). Pp. 105–109. DOI: 10/31040/2222-8349-2018-5-3-105-109. (In Russian.)

34. Kotlyarov D. V., Kotlyarov V. V., Fedulov Yu. P. Fiziologicheski aktivnye veshchestva v agrotekhnologiyakh [Physiologically active substances in agricultural technologies]. Krasnodar: Kubanskiy gosudarstvennyy agrarnyy universitet imeni I. T. Trubilina, 2016. 224 p. (In Russian.)

35. Lekontseva T. G., Khudyakova A. V., Isaeva A. N., Fedorov A. V. Optimizatsiya nekotorykh etapov mikroklonal'nogo razmnozheniya chayno-gibridnoy rozy sorta Anzhelika [Optimization of some stages of micropropagation of hybrid tea rose cv. Angelica] // Bulletin of Perm university. Biology. 2017. No. 3. Pp. 240–244. (In Russian.)

Authors' information:

Aleksandr V. Fedorov¹, doctor of agricultural sciences, chief researcher, ORCID 0000-0003-2759-2037, AuthorID 219069; +7 950 820-25-65, oiar@udman.ru

Albina R. Filippova¹, junior scientist researcher, ORCID 0000-0001-8470-8820, AuthorID 825076; +7-963-549-93-77, albinafil@udman.ru

Tatyana G. Lekontseva¹, scientist researcher, ORCID 0000-0002-6659-0504, AuthorID 637255; +7 950 155-20-26, t.lekontseva@yandex.ru

¹ Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia