

MICROPROPAGATION OF *Ruta graveolens* L.

Chingarova A.¹, Dimitrova M.^{1*}, Gyurova V.¹, Doycheva I.¹, Dencheva E.¹, Dzhurmanski A.², V. Kapchina-Toteva¹

¹ Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, St. Kl. Ohridski Sofia University, 8 Dragan Tzankov Blvd, 1164 Sofia, Bulgaria,

*corresponding author e-mail: madimitrova@yahoo.com

² Institute for roses and aromatic plants 6100 Kazanlak, Bulgaria

ABSTRACT

Wide application of *Ruta graveolens* L in pharmaceutical and cosmetic industry has led to increased interest in plant production. Explants obtained from vegetative stem segments were grown on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations (0.1 – 1.0 mg.l⁻¹) of the cytokinin BA (6-benzylaminopurine) and auxin IBA (indole-3-butyric acid) to evaluate the optimal concentrations for multiple proliferation. All concentration of BA stimulated callusgenesis and number of shoots. The highest number of shoots was achieved on MS medium with 1,0 mg.l⁻¹ of BA (88,57±2,44) compared to control plants. Different concentrations of IBA did not influence number of shoots and root formation.

Key words: *Ruta graveolens* L., *in vitro* propagation, auxin, cytokinin

ВЪВЕДЕНИЕ

Ruta graveolens (семејство Rutaceae – седефче) е ароматно медицинско растение, разпространено в Европа и Средиземноморскиот регион. Притежава противовъзпалително, противоепилептично, противоглистно и антитуморно действие (Ivanova et al. 2005, Preethi et al., 2006). Намира приложение при лечението на кожни заболувања и множествена склероза (Massot et al., 2000). Съдържа кумарини, фуорохолини, акридонови алкалоиди, флавоноиди и етерични масла. Флавоноидите изолирани од седефчето притежават антибактериално действие (Anonymus, 2003), а акридоновите алкалоиди – антивирусно и антиплазмодийно дејствија.

Медицинските растения са важен източник на вторични метоболити за фармацевтичната индустрија и традиционната медицина. Голямото търсене на лечебни растения води до хищническа експлоатација на находищата им или до тяхното унищожаване. Някои видове са редки или застрашени, като причината за този статут е целостната увреждаща човешка дейност, вклучително и събирането на растенијата.

Микроразмножаването е метод за бързо вегетативно размножаване и набавяне за кратък период на големи количества генетично непроменен и идентичен с изходниот, набавен од природата, чист од патогени растителен материјал. Разработването на подходящи хранителни среди за мултипликација *in vitro* е од съществено значење и за получаването на линии с непроменен синтез на ценните за фитотерапијата вторични метоболити. Разработването на протокол за микроразмножаване и *ex vitro* адаптација на даден растителен вид е основа и за *ex situ* презервација на застрашени или исчезвајќи растителни видове.

Цел на настоящото истражување е да се проследи влијанието на различни концентрации растежни регулатори (BA:0,1-1,0 mg.l⁻¹) и (IBA:0,1-1,0mg.l⁻¹) върху размножителниот коефициент и да се разработи подходящ протокол за микроразмножане на *Ruta graveolens* L.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Растенијата од *Ruta graveolens* L. ни бяха предоставени од гл.асистент д-р Анатоли Джурмански (Институт по розата и етеричномаслените култури, гр. Казанлък). Експлантите, съдържајќи малка част од стъблото и една аксиларна пупка са стерилизирани за 8 мин с 0,1

% HgCl_2 , промивани трикратно с дестилирана вода и култивирани върху основна MS (Murashige and Skoog, 1962) среда с 3% захароза и 0.7% агар. Растенията са размножавани всеки четири седмици върху стандартна MS среда. В култивационното помещение е поддържана температура 22-23°C, фотопериод 16/8 часа (ден/нощ) и интензивност на осветлението $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Експлантите (30 броя за всеки вариант) от контролните растения са прехвърляни на MS среда с добавени към нея различни концентрации (0,1-1,0 mg.l^{-1}) на бензиламинопурина (BA) и индолилмаслена киселина (IBA). Паралелно се залагат и контролни растения без растежни регулатори. След четириседмично култивиране са проследени основните морфометрични показатели (дължина, брой стъбла, коренообразуване, калусообразуване и витрификация). Изходните данни са обработени статистически със стандартен Excel софтуер и достоверността на разликите е сравнена и показана като стандартна грешка на средните стойности (S.E.M. n-1).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ефективността на *in vitro* размножаването зависи в голяма степен от използването на растежни регулатори, основно от тяхната концентрация и съотношение. Ауксините индуцират клетъчното делене, стимулират коренообразуването, контролират морфогенезата, но инхибират отварянето и развитието на аксиларните пъпки (Tomson and Gertner, 2003; Pati et al., 2004). Цитокинините имат важна роля при клетъчното делене, морфогенеза на стъбло и корен, образуването на странични пъпки. Ниските концентрации предизвикват образуването на по-малък брой латерални стъбла (Welandar, 1985), за разлика от високите, които увеличават размножителния коефициент, но могат да индуцират образуване на калус и да предизвикат витрификация (Dunstan et al., 1985). Всички варианти на BA стимулират средния брой стъбла, като броят на стъблата се увеличава с нарастване на концентрацията. Най-високи стойности са отчетени при 1,0 mg.l^{-1} BA ($88,57 \pm 2,44$) спрямо контролния вариант (сн.1 и 2). Стъблата са многообройни за сметка на тяхната дължина и силно оводнени. Листата са малки, неоформени и силно оводнени. Калусообразуване се наблюдава при всички варианти на BA, като нараства с повишаване на концентрацията. Образуваният калус е рехав, жълто-зелен. Витрификация се наблюдава при всички варианти с добавен към средата BA, като растенията са с оводнени, удебелени стъбла и силно скъсени междувъзлия, което ги прави негодни за мултипликация и адаптация *екс vitro* (снимка 2). Коренообразуване не се наблюдава в нито един от вариантите, както и в контролния вариант (Таблица 1). По-ниски, но аналогични резултати са получени при добавяне към средата на различни концентрации от BA, Тидиазурон и Индолил-3-оцетна киселина (IAA), както и комбинации между тях. Максимален брой стъбла ($58,0 \pm 1,51$) и средна дължина на стъблата ($3,2 \pm 0,2$) са установени при използване на комбинация от BA-1,0 mg.l^{-1} и IAA-0,25 mg.l^{-1} (Bohidar et al., 2008; Diwan and Malpatak, 2008). В друга моделна система стъблени експлантите са регенерирани от калусна култура с добавени към хранителната среда растежни регулатори в различни концентрации – BA, кинетин, IAA, IBA и α -нафтил-оцетна киселина (NAA), като максимален брой стъбла (92,3 %) са установени при добавени към средата на 7,5 μM BA и 1,0 μM NAA (Ahmad et al., 2010).

Таблица 1. Влияние на различни концентрации на ВА (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху основните морфометрични показатели при *ин vitro* размножаване на *Ruta graveolens* L.

Варианти	Среден брой стъбла	Дължина на стъблата (см)	Корено образуване	Калусо образуване	Витрификация
Контрола	2,00±0,63	2,33±0,53	-	-	-
0,1 ВА	34,17±3,57	2,66±0,47	-	+	+
0,2 ВА	51,57±3,77	2,64±0,34	-	++	+
0,3 ВА	58,57±3,78	2,21±0,28	-	++	+
0,4 ВА	61,67±5,34	1,79±0,39	-	++	+
0,5 ВА	65,71±5,35	1,89±0,35	-	+++	+
0,6 ВА	68,75±6,41	1,93±0,53	-	+++	+
0,7 ВА	66,43±2,89	1,96±0,55	-	+++	+
0,8 ВА	77,50±4,63	1,79±0,27	-	++++	+
0,9 ВА	83,33±2,58	2,17±0,30	-	++++	+
1,0 ВА	88,57±2,44	2,03±0,26	-	++++	+



Сн.1 контрола-без растежни регулатори



Сн. 2 - 1,0 mg.l⁻¹ ВА



Сн. 3 0,4 mg.l⁻¹ ВА

Различните концентрации на ВА (0,1-1,0 mg.l⁻¹) не влияят върху средния брой стъбла и коренообразуването. Високите концентрации на ВА (0,9-1,0 mg.l⁻¹) симулират удължаването на стъблата. (Таблица 2). Не се наблюдава витрификация при *ин vitro* растенията от *Ruta graveolens* L. с прибавени към средата различни концентрации на ВА (снимка 3). В други моделни системи, добре развита коренова система със средна дължина

на корените ($4,5 \pm 0,4$) е установена при микроразмножаване на редуцирана, $\frac{1}{2}$ MS и $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA. В контролния вариант, както и в нашата моделна система не е установено коренообразуване, което потвърждава първостепенната роля на генотипа по отношение ефектите на растежните регулатори ин витро (Bohidar et al., 2008).

Таблица 2 Влияние на различни концентрации на IBA ($0,1-1,0 \text{ mg.l}^{-1}$) върху основните морфометрични показатели при ин витро размножаване на *Ruta graveolens* L.

Варианти	Среден брой стъбла	Дължина на стъблата (см)	Корено образуване	Калусо образуване	Витрификация
Контрола	$2,00 \pm 0,63$	$2,33 \pm 0,53$	-	-	-
0,1 IBA	$2,00 \pm 0,58$	$4,50 \pm 0,71$	-	-	-
0,2 IBA	$2,00 \pm 0,58$	$4,21 \pm 0,91$	-	-	-
0,3 IBA	$2,00 \pm 0,82$	$3,86 \pm 1,03$	-	-	-
0,4 IBA	$1,86 \pm 0,38$	$4,29 \pm 0,49$	-	-	-
0,5 IBA	$1,57 \pm 0,53$	$3,64 \pm 0,75$	-	-	-
0,6 IBA	$1,86 \pm 0,38$	$4,10 \pm 0,54$	-	-	-
0,7 IBA	$1,83 \pm 0,98$	$3,92 \pm 0,86$	-	-	-
0,8 IBA	$1,83 \pm 0,38$	$3,86 \pm 1,14$	-	+	-
0,9 IBA	$1,71 \pm 0,49$	$4,60 \pm 1,00$	-	+	-
1,0 IBA	$1,50 \pm 0,54$	$4,75 \pm 0,69$	-	+	-

ИЗВОДИ

Получените резултати ни позволяват да направим следните изводи:

- Повишаването на концентрацията на IBA ($0,1 - 1,0 \text{ mg.l}^{-1}$) стимулира броя на стъблата, калусообразуването и витрификацията. Максимален брой стъбла спрямо контролния вариант без растежни регулатори са отчетени при $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA ($88,57 \pm 2,44$).
- Добявянето на ауксин в хранителната среда не стимулира образуването на по-голям брой стъбла, коренообразуването и калусообразуването. Високите концентрации на IBA стимулират средната дължина на стъблата.
- IBA- $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ стимулира в най-голяма степен биосинтеза на феноли и флавоноиди (непубликувани данни) в сравнение с контролата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата разработка е финансирана по проект № 68/2011 фонд НИ към СУ "Св.Климент Охридски, България.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmad N., M. Faisal, M. Anis, I. Aref, 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. South African Journal of Botany 76, 597-600.

2. Anonymous, 2003. The wealth of India, Raw Material, V. R Publication and Information Directorate. CSIR, New Delhi, India, 95–96.
3. Bohidar, S., M. Thirunavoukkarasu, T.Rao, 2008. Propagation of *Ruta graveolens* L. by *in vitro* culture of nodal explants. Indian Journal of Plant Physiology 13
4. Bohidar, S., M. Thirunavoukkarasu, T. Rao, 2008. Effects of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of garden rue (*Ruta graveolens* L.). International Journal of Integrative Biology 3, 36-43.
5. Diwan R, N. Malpathak, 2008. Novel technique for scaling up of micropropagated *Ruta graveolens* shoots using liquid culture systems: A step towards commercialization. New Biotechnology 25, 85-91.
6. Dunstan, D., K. Turner, W. Lazaroff, 1985. Propagation *in vitro* of the apple rootstock M4: Effect of phytohormones on shoot quality, Pl. Cell Tiss. Org. Cult., 4, p. 55-60.
7. Ivanova et al., 2005. Short report-Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. Fitoterapia 76, 344-347.
8. Massot B. et al., 2000. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 62, 11-19.
9. Murashige, T., F. Skoog, , 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473–494.
10. Pati, P., O. Prakash, M. Sharma, A. Sood, P. Ahuja, 2004. Growth performance of cuttings raised from *in vitro* and *in vivo* propagated stock plants of *Rosa damascena* Mill., Biologia Plantarum, 48(4), p. 609-611.
11. Preethi K., G. Kuttan, R. Kuttan, 2006. Anti-tumour activity of *Ruta graveolens* extracts. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 7, 439-443.
12. Tomson, S., D. Gertner, 2003. *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*, Biologia Plantarum, 46(3), p. 463-465.
13. Welander, M., 1985. *In vitro* shoot and root formation in the apple cultivar Akero, Ann. Bot., 55, p. 249-261.