

MICROPROPAGATION AND SECONDARY METABOLITES OF *NEPETA SPP.*

Dimitrova M.^{1*}, Kosev K.¹, Nedelkova Y.¹, Yordanova Zh.¹, A.Dzhurmanski²,
Kapchina-Toteva V.¹

¹Department 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

²Institute for Roses and Aromatic Plants, 6100 Kazanlak, Bulgaria

ABSTRACT

Nepeta grandiflora L. possesses diuretic, antispasmodic, antiasthmatic, antioxidant and sedative properties. The effect of different concentrations (0,1-1,0mg.l⁻¹) of cytokinin BA (6-Benzylaminopurine) and auxin IBA (Indole-3-butyric acid) on *in vitro* propagation and the amount of secondary metabolites was investigated. High concentrations of BA stimulated total phenolic content compared with plants propagated on MS medium supplemented with IBA. So far, this is the first report on *in vitro* propagated *Nepeta grandiflora* L. through direct plant regeneration technique and it offers an effective alternative method for propagation and preservation of this important medicinal plant.

Key words: *Nepeta grandiflora* L., *in vitro* propagation, auxin, cytokinin, secondary metabolites

ВЪВЕДЕНИЕ

Род *Nepeta* (сем. Lamiaceae) обхваща около 250 едногодишни и многогодишни вида, разпространени в Европа, Азия, Северна Африка и планинските райони на Африка (Mabberley, 1997). *Nepeta grandiflora* L. е етерично-маслено растение принадлежащо към род *Nepeta*. Притежава противовъзпалително, отхрачващо, противоасматично, диуретично и кръвоспиращо действие. Съдържа монотерпени, сесквитерпени, непетолактони, циклопентаноидни иридоиди, флавоноиди и феноли. В етерични масла от *Nepeta grandiflora* L. са идентифицирани в големи количества гермакрин Д и β-кариофилин-съединения притежаващи отблъскващ ефект към житните въшки (Birkett et al. 2010).

Интересът към медицинските растения се обуславя от възможността за получаване *in vitro* на биологично активни вещества и приложението им във фитотерапията, особено при ограничен растителен ресурс, следствие най-често от нелимитирано и неправилно използване на растенията. Установени са множество разнообразни алкалоиди, сапонини, кардеолипиди, полифеноли и терпени, продуцирани от *in vitro* култивирани медицински растения. (Matkowski, 2008).

Цел на настоящото изследване е да се проследи влиянието на различни концентрации на цитокинина бензиламинопуриин (0,1-1,0 mg.l⁻¹) и ауксина индолилмаслена киселина (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху основни показатели на микроразмножаването и количеството на вторичните метаболити в *Nepeta grandiflora* L.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

Растенията от *Nepeta grandiflora* L. ни бяха предоставени от гл.асистент д-р Анатоли Джурмански (Институт по розата и етеричномаслените култури, гр. Казънлък). Експланти, съдържащи малка част от стъблото и една аксиларна пъпка са стерилизирани за 8 мин с 0,1 % HgCl₂, 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 μmol.m⁻².s⁻¹. Експланти (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

бензиламинопури (ВА) и индолилмаслена киселина (ИВА). 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).

2. *Количество на феноли* - метод на Singleton et al., (1999).

3. *Количество на флавоноиди* - метод на Chang et al., (2002).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В последните години се наблюдава нарастващ интерес към откриването на естествени антиоксиданти, които защитават и предпазват клетките от промени, вследствие на оксидативен стрес.

Прибавянето на растежни регулатори в хранителната среда в зависимост от генотипа, може да стимулира вторичния метаболизъм и да повиши синтеза на феноли, притежаващи антиоксидантни свойства. В нашата моделна система, всички варианти на ВА стимулират средния брой стъбла, като най-високи стойности са отчетени при 0,6 и 1,0 mg.l⁻¹ (3,72±1,9 и 4,60±2,90, съответно). ВА индуцира калусообразуване във всички концентрации, като се наблюдава правопрпорционална зависимост с увеличаване на концентрацията. Наблюдава се и стимулиране на коренообразуването в концентрации от 0,1 до 0,6 mg.l⁻¹ ВА, като при контролния вариант се отчита най-висока средна дължина на корените (Таблица 1).

Таблица 1. Влияние на различни концентрации на ВА (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху основните морфометрични показатели (среден брой и дължина на стъблата, коренообразуване, калусообразуване) при ин vitro размножена *Nepeta grandiflora* L.

Варианти	Среден брой стъбла	Дължина на стъблата (см)	Корено образуване	Дължина на корените	Калусо образуване
Контрола	1,80±0,40	4,80±1,90	+	2,21±0,53	-
0,1 ВА	2,09±0,50	4,54±1,88	+	1,57±0,59	+
0,2 ВА	2,33±0,90	5,48±2,48	+	1,86±0,44	+
0,3 ВА	2,72±0,96	4,16±1,70	+	1,34±0,89	+
0,4 ВА	2,70±0,13	5,00±3,90	+	1,17±0,74	+
0,5 ВА	2,30±0,80	5,06±1,19	+	1,20±0,20	+
0,6 ВА	3,72±1,90	3,88±2,40	+	1,40±0,30	++
0,7 ВА	2,67±2,30	4,20±1,40	-	-	++
0,8 ВА	1,83±0,39	5,36±1,70	-	-	++
0,9 ВА	2,00±0,50	4,80±1,20	-	-	++
1,0 ВА	4,60±2,90	4,10±1,60	-	-	++

При *in vitro* размножаване на три ендемични вида от род *Nepeta* - *N. rtanjensis*, *N. sibirica* и *Nepeta nervosa* върху основна ½ MS без добавени към средата растежни регулатори максимална дължина на стъблата е отчетена при *Nepeta nervosa* L. (5.84±2.50). Най-висок

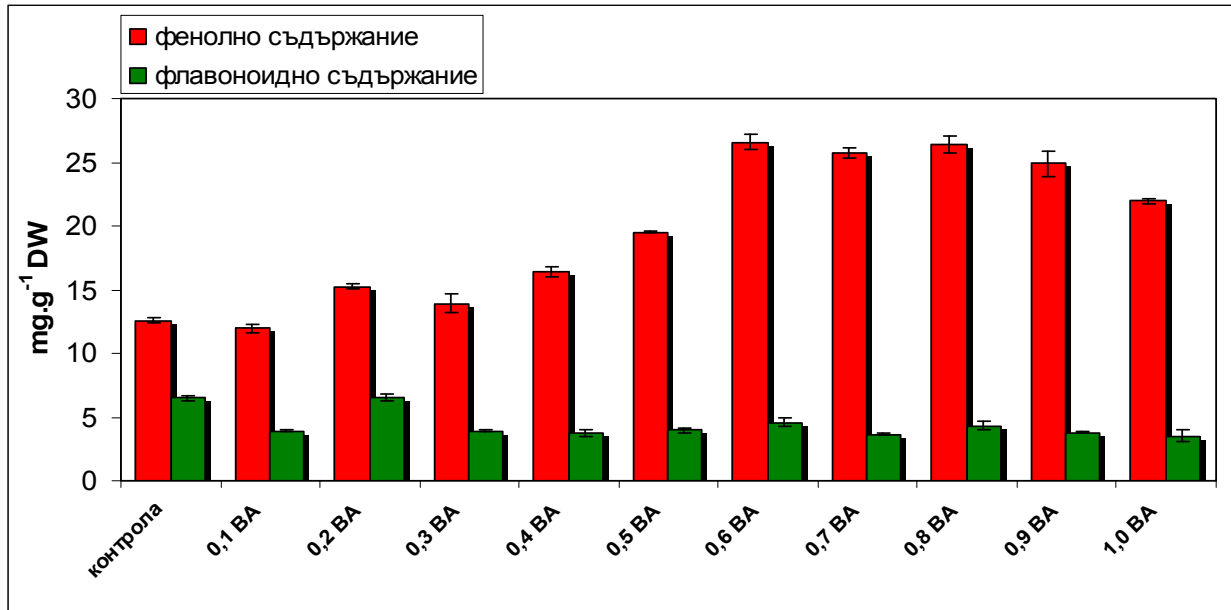
процент коренообразуване е отчетено при същото растение (Nestorović et al., 2010). В нашата моделна система ИВА стимулира дължината на стъблата в концентрации от 0,3 до 1,0 mg.l⁻¹ спрямо контролния вариант, като най-високи стойности са отчетени при 0,3, 0,9 и 1,0 mg.l⁻¹ (7,45±3,60; 7,01±2,35 и 7,51±1,95, съответно). Всички концентрации на ИВА подтискат калусообразуването и стимулират коренообразуването във всички варианти (Таблица 2).

Таблица 2. Влияние на различни концентрации на ИВА (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху основните морфометрични показатели (среден брой и дължина на стъблата, коренообразуване, калусообразуване) при *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L.

Варианти	Среден брой стъбла	Дължина на стъблата (см)	Корено образуване	Дължина на корените	Калусо образуване
Контрола	1,80±0,40	4,80±1,90	+	2,21±0,53	-
0,1 ИВА	1,77±0,66	4,36±1,55	+	1,32±0,73	-
0,2 ИВА	1,50±0,52	4,61±1,48	+	1,76±0,84	-
0,3 ИВА	1,90±0,30	7,45±3,60	+	1,99±0,95	-
0,4 ИВА	2,00±0,45	6,00±2,43	+	1,74±0,61	-
0,5 ИВА	1,72±0,47	6,20±3,00	+	1,75±0,81	-
0,6 ИВА	1,82±0,40	6,35±3,90	+	1,40±0,91	-
0,7 ИВА	1,66±0,49	6,59±2,80	+	1,30±0,66	-
0,8 ИВА	2,09±1,04	6,80±3,30	+	1,46±0,59	-
0,9 ИВА	1,77±0,44	7,01±2,35	+	1,22±0,59	-
1,0 ИВА	1,83±0,39	7,51±1,95	+	1,35±0,79	-

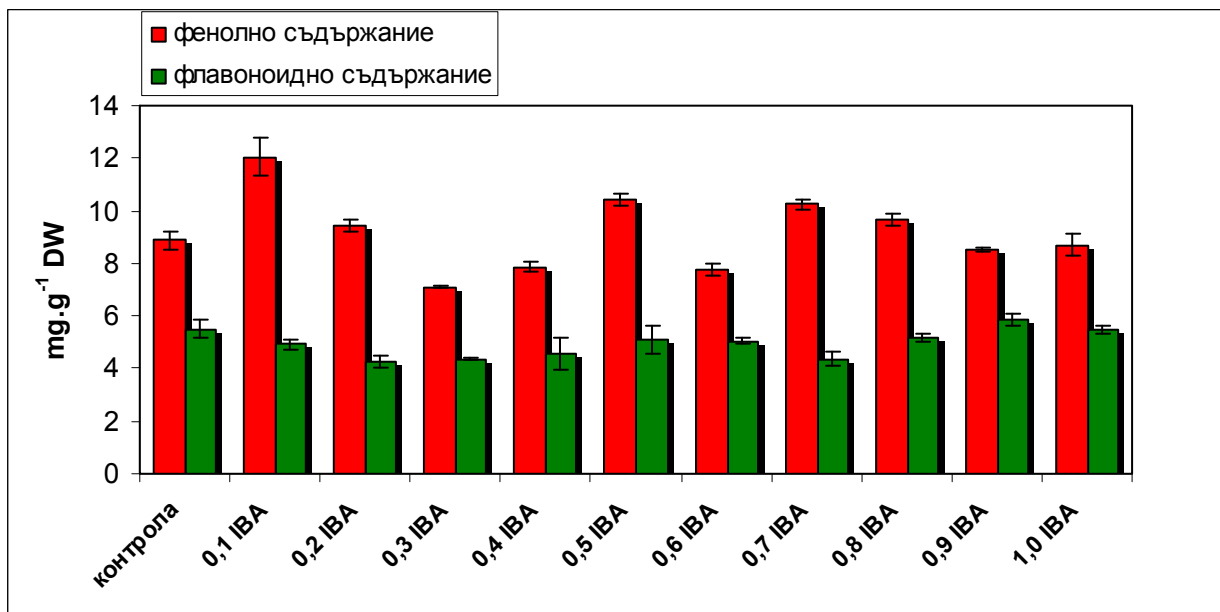
Вторичните метаболити към които принадлежат фенолите и флавоноидите стабилизират несдвоените електрони и хелатират йоните на преходните метали (Rice-Evans et.al. 1997), проявяват се като донори на протони и електрони и изменят кинетиката на прекисното окисление на мембранните липиди (Arora et.al. 2000). Те притежават антиоксидантна, противовъзпалителна, противоракова и антивирусна активност.

Високите концентрации на ВА от 0,6 - 1,0 mg.l⁻¹ повишават значително количеството на тоталните феноли при *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L в сравнение с контролния вариант (Фигура 1). При всички варианти количеството на тоталните флавоноиди е значително по-ниско в сравнение с контролния вариант.



Фигура 1. Влияние на различни концентрации на БА (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху тоталното фенолно и флавоноидно съдържание при *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L.

Различни концентрации на ИМК прибавени към хранителната среда незначително повишават количеството на тоталните феноли в концентрации 0,1, 0,5 и 0,7 mg.l⁻¹ (Фигура 2). От двата растежни регулатора, прибавени към хранителната среда БА, повлиява в по-голяма степен количеството на определяните вторични метаболити в сравнение с ИВА. В достъпната ни литературата не се срещат данни за *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L. При определяне количеството на тотални феноли в хексанов, дихлорметанов и метанолов екстракти от *Nepeta flavida* Hub.-Мог най-високо количество на тотални феноли са установени в метаноловия, следван от хексановия и дихлорметания екстракти (Тере et al., 2007).



Фигура 2. Влияние на различни концентрации на ИМК (0,1-1,0 mg.l⁻¹) върху тоталното фенолно и флавоноидно съдържание при *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените от нас резултати ни позволяват да направим следните изводи:

1. Всички концентрации на ВА (0,1–1,0 mg.l⁻¹) стимулират броя на стъблата, калусообразуването и коренообразуването в концентрации от 0,1–0,6 mg.l⁻¹.
2. Високите концентрации на ВА (0,6 - 1,0 mg.l⁻¹) стимулират в най-голяма степен биосинтеза на феноли при *in vitro* размножена *Nepeta grandiflora* L в сравнение с контролния вариант.
3. Концентрацията 0,5 mg.l⁻¹ ИВА е оптимална по отношение на дължина, брой стъбла и биосинтез на феноли.
4. От двата растежни регулатора прибавени към хранителната среда, ВА повлиява в по-голяма степен количеството на вторични метаболити в сравнение с ИВА.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата разработка е финансирана от договор № 68/2011 на фонд НИ при СУ "Св.Климент Охридски, България.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arora A., M. Byrem, M. Nair, G. Strasburg, 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Archives Biochem. And Biophys. 373, 102-109.
2. Birkett M., T. Bruce, J. Pickett., 2010. Repellent activity of *Nepeta grandiflora* and *Nepeta clarkei* (Lamiaceae) against the cereal aphid, *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). Phytochemistry letters 3, 139-142.
3. Chang C, M Yang., M.Wen, C. Chern, 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by twocomplementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10,178–182.
4. Mabberley DJ., 1997.The plant book. second ed. Cambridge: CambridgeUniversity Press
5. Matkowski A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. Biotechnology Advances 26, 548-560.
6. Murashige T, F.Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissuecultures. Physiologia Plantarum 15, 473-49.
7. Nestorović J., D. Mišić, B. Šiler, M. Soković, J. Glamočlija, A. Ćirić, V.Maksimović, D.Grubišić., 2010. Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity, Fitoterapia 81, 621-626.
8. Rice-Evans C., N. Miller, G. Paganga, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trend Plant Science 2, 152-159.
9. Singleton V, R. Orthofer, R.Lamuela-Raventós, 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin–Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology, 299,152–178.
10. Tepe B., D. Daferera , A. Tepe , M. Polissiou, A. Sokmen., 2007. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. Food Chemistry 103, 1358–1364.