

## IN VITRO МУЛТИПЛИКАЦИЯ НА ЧЕТИРИ ВИДА ОТ РОД GONIOLIMON

ДЕНИЧКА МАНОЛОВА\*, НАДЕЖДА ЗАПРЯНОВА, АНДРЕЙ КАНИНСКИ

Институт по декоративни растения – Негован, София

\*E-mail: denichka\_manolova@abv.bg

### In vitro Multiplication of Four Species of Genus *Goniolimon*

D. Manolova\*, N. Zaprianova, A. Kaninski

Institute of Ornamental plants – Negovan, Sofia, Bulgaria

#### Abstract

The species from genus *Goniolimon*: *Goniolimon besserianum* (Schult. ex Rchb.) Kusn., *Goniolimon collinum* (Griseb.), *Goniolimon dalmaticum* (C. Presl) Rchb. f., *Goniolimon tataricum* (L.) Boiss. are included in the Red Data Book of the Republic of Bulgaria and Annex № 3 of the Biodiversity Act. The aim of the study was to clarify the impact of benzylaminopurine (BAP) on the multiplication factor and to establish at what concentrations the plants showed normal growth. Seeds of the four species were collected in their natural habitats in Bulgaria and used as starting material. One hundred seeds of every species were first sterilized by immersion in 70% ethanol for 40 sec and then surface-sterilized with 30% commercial bleach for 20 min followed by four times rinsing with sterile distilled water. The seeds were cultured *in vitro* on MS basal salts + 6 g/l agar + 30 g/l sucrose. After two months explants were sub-cultured on the same medium supplemented with different concentrations of BAP (0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l and 2 mg/l). The results showed that high multiplication factor (5.58) was obtained for *G. besserianum* at concentration 0.1 mg/l BAP. At the same concentration good results were obtained for *G. collinum* (4.75). For *G. dalmaticum* in comparison to the lower concentrations of BAP best variant was recorded at BAP 0.5 mg/l (5.25). At 1 mg/l BAP in *G. tataricum* higher multiplication factor (3.6) was achieved.

**Key words:** *Goniolimon*, BAP, *in vitro*, multiplication

Видовете от род *Goniolimon* (сем. *Plumbaginaceae*), разпространени в нашата страна, са многогодишни тревисти растения с ценни декоративни качества. Според направената оценка по критериите на IUCN *Red List of Threatened Plants* на регионално ниво видът *Goniolimon dalmaticum* е отнесен към категорията „Критично застрашен вид в българската флора“; като „Застрашен“ са категоризирани *Goniolimon besserianum*, *Goniolimon collinum* и *Goniolimon tataricum*. Между тези видове особен интерес представлява *Goniolimon dalmaticum*, който е балкански ендемит.

Представителите на род *Goniolimon* са обвързани със специфични местообитания, като популациите им са малочислени и малко на брой. Поради техните декоративни качества те са особено уязвими и събирането им от естествените местообитания за аранжиране на свежи и сухи букети е реална заплаха за тяхното съществуване (Витанова и др., 1999; Иванова и др., 2008; Канински и др., 2000). От друга страна, промяната в климатичните условия и засиленото антропогенно въздействие от различно естество и с различна интензивност оказват негативно влияние, както върху условията в местооби-

танията, така и върху размера и жизнеността на популациите (Лапин, 1984). Проблемите, свързани с биологичните особености на семената и най-вече с поникването им са от голямо значение за успешното размножаване на змийските треви. За да се задоволи нарастващото търсене на пазара се налага производството на качествен посадъчен материал.

В цветопроизводството през последните няколко десетилетия все по-голяма част от декоративните растения започнаха да се размножават чрез използването на тъканните култури. Това е надежден метод за размножаване в случай, че конвенционалното размножаване е неприложимо, също така играе съществена роля при съхраняването и обогатяването на растителния генофонд (Витанова и др., 2003; Martin and Perez, 1995). Използването на микроразмножаването с цел опазване на застрашени видове е доказано успешен метод за широк спектър от растения (Даунс, 1994). Чрез *in vitro* размножаването може да се получи голям брой растения от минимално количество растителен материал, като така се нанасят незначителни щети на застрашените видове.

Една от най-важните фази при използване мето-

да на тъканните култури е фазата мултипликация. При нея ключова роля играят растежните регулатори, по-точно групата на цитокинините. Въпреки че те се смятат за основен фактор за преодоляване на апикалната доминантност и излизането от покой на страничните пъпки, механизмът им на действие не е точно изяснен и за тях е характерна селективност на физиологичното действие по отношение на различните растителни видове (Георгиева и др., 2009). В редица изследвания при микро-размножаването на декоративните видове 6-бензиламинопурина (BAP) се използва самостоятелно в различни концентрации за установяване действието му върху размножителния коефициент на културите (Ненчева, 2009; Bhosale et al., 2011; Hassan et al., 2013). Научните разработки, касаещи фазата мултипликация при сем. *Plumbaginaceae* се отнасят предимно за видовете от род *Limonium* (Martin and Perez, 1995; Hsu et al., 2000). Като представители на едно семейство видовете от род *Limonium* и род *Goniolimon* са близки в генетично отношение, но и проявяват характерни особености на вида, към който принадлежат.

Целта на изследването беше да се установи влиянието на 6-бензиламинопурина (BAP) върху развитието на 4 вида от род *Goniolimon*, *Plumbaginacea*, като същевременно се осигури по-висок мултипликационен коефициент в съчетание с нормален растеж и развитие на микрорастенията.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За изследването са използвани по 100 семена от 4 вида от род *Goniolimon*, *Plumbaginacea*: *Goniolimon besserianum*, *Goniolimon dalmaticum*, *Goniolimon collinum* и *Goniolimon tataricum*. Семенният материал е събран от естествените местообитания на видовете в България. Семената са преминали през процедура на повърхностна стерилизация – 40 секунди в 70% разтвор на етанол, 20 минути – в 30% разтвор на комерсиална белина, след което са измити четири пъти в дестилирана вода. За въвеждането на семената в ин витро култура е използвана среда, съдържаща MS basal + 6 g/l агар + 30 g/l захароза. Относителното рН на средата преди стерилизация бе 5,7 – 5,8. Културите са отглеждани във фитостатно помещение при температура 22 °C, осветление 3000 lux и 16/8 часа – ден/нощ фотопериод. След 60 дни нодални сегменти (с дължина 1 cm) бяха прехвърлени на четири варианта среда MS basal + 6 g/l агар + 30 g/l захароза + BAP (0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l и 2 mg/l). След два месеца растенията бяха пасирани върху свежа хранителна среда MS basal + 6 g/l агар + 30 g/l захароза, като бяха отчетени мултипликационният коефициент и дължината на издънките.

Мултипликационният коефициент се изчислява по формулата:  $МК\% = N \times A / 100$ , където N е брой новообразувани издънки, A - % мултиплицирани растения (Tsvetkov, 1998).

Статистически данни са обработени и анализирани за достоверност чрез t тест на програмата GraphPad Prism.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При използване на хранителна среда на отглеждане без наличието на BAP, видовете от род *Goniolimon* имат ниска мултипликационна способност – средно от вид се формират от 1-3 издънки. Най-добра естествена размножителна способност е отчетена при *G. collinum* и *G. besserianum* – формиране на 2-3 нови издънки. Добавянето на различни концентрации на BAP в хранителната среда предизвиква в 4 вида на род *Goniolimon* специфична реакция на мултиплициране.

Ефектът от действието на BAP върху мултипликационния процес при видовете от род *Goniolimon* се наблюдава месец след залагане на растенията върху хранителната среда.

Най-висок мултипликационен коефициент е отчетен при *G. besserianum* – 5,58 при 0,1 mg/l BAP. Видът образува голям брой издънки с размер под 1 cm – съответно 7,5 при 0,1 mg/l BAP и 5 – при 1 mg/l BAP. *G. collinum* формира на издънки над 1 cm при 0,1, 0,5 и 1 mg/l концентрации на BAP. При този вид по-ниският мултипликационен коефициент се компенсира с образуването на по-големи по размер издънки (фиг. 1). При вида *G. dalmaticum* използването на 0,5 mg/l BAP дава най-висок мултипликативен ефект – 5,25. Единствено при *G. tataricum* използването на по-висока концентрация на BAP – 1 mg/l, дава по-висок мултипликационен коефициент в сравнение с по-ниско използваните концентрации (фиг. 1). При BAP 1 mg/l и особено при 2 mg/l растенията реагират с формирането на туфи от множество издънки под 0,5 cm, които на този етап не могат да бъдат отчетени като бройка и не влизат в определянето на мултипликационния коефициент. Големият брой издънки забавя развитието на по-големи качествени експлантите (Joshi and Dhar, 2003).

При *Limonium wrightii* най-добри резултати за мултипликация са получени при MS основна + 6 g/l агар + 30 g/l захароза + BAP 2 mg/l + NAA 0,2 mg/l (Hsu et al., 2000). Самостоятелното използване на BAP при *Aquilegia hirta* дава най-много качествени издънки при концентрация 0,1 mg/l (Hassan et al., 2013), докато при импатиенс Нова Гвинея най-добри резултати при всички изпитани сортове е дала MS основна + 7 g/l агар + 30 g/l захароза + BAP 2 mg/l (Ненчева, 2009).

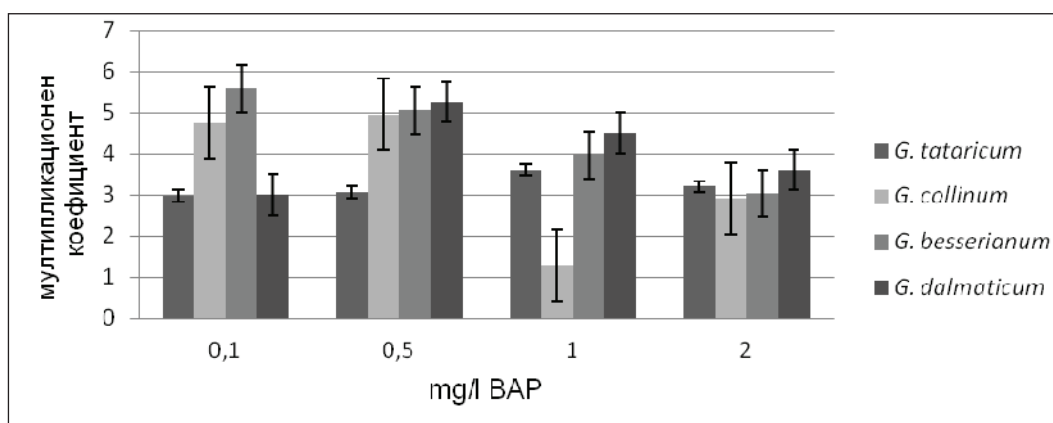
На втория месец от залагане на опита се наблюдава отделяне от първоначално оформените следствие действието на BAP туфи на жизнени издънки с размер над 1 cm, които се използват на следващия етап от размножаването на видовете вкореняване.

Нарастването на мултипликационен коефициент

Таблица 1. Влияние на различни концентрации ВАР при четири вида от род *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum*

Table 1. Effect of different concentrations of BAP in four species of the genus *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum*

Разтвор на ВАР		Вид			
		<i>G. tataricum</i>	<i>G. collinum</i>	<i>G. besserianum</i>	<i>G. dalmaticum</i>
0,1 mg/l	Брой издънки > 1 cm	2,4 ± 0,6	6,6 ± 0,6	5,0 ± 0,4	5,4 ± 0,4
	Брой издънки < 1 cm	7,2 ± 0,5	20,4 ± 1,4	9,6 ± 0,9	6,2 ± 0,3
	% мултиплицирани растения	90	95	90	90
0,5 mg/l	Брой издънки > 1 cm	7,0 ± 0,4	10,20 ± 1,8	5,4 ± 0,4	12,4 ± 1,2
	Брой издънки < 1 cm	6,4 ± 0,9	8,8 ± 0,9	15,4 ± 2,0	8,6 ± 1,6
	% мултиплицирани растения	90	95	90	90
1 mg/l	Брой издънки > 1 cm	5,8 ± 0,5	9,2 ± 1,8	16,6 ± 2,4	5,8 ± 0,5
	Брой издънки < 1 cm	12,2 ± 1,2	13 ± 1,5	4,6 ± 0,5	12,2 ± 1,2
	% мултиплицирани растения	90	90	95	90
2 mg/l	Брой издънки > 1 cm	5,8 ± 0,6	6,8 ± 1,5	4,6 ± 0,5	5,2 ± 0,2
	Брой издънки < 1 cm	14,0 ± 1,8	11,4 ± 1,8	1,6 ± 0,4	13,4 ± 1,0
	% мултиплицирани растения	90	85	90	85



Фиг. 1. Влияние на различните концентрации на ВАР върху мултипликационния коефициент при четири вида от род *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum* – 1 месец  
 Fig. 1. Effect of different concentrations of BAP on the multiplication coefficient in the four species of the genus *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum* – 1 month

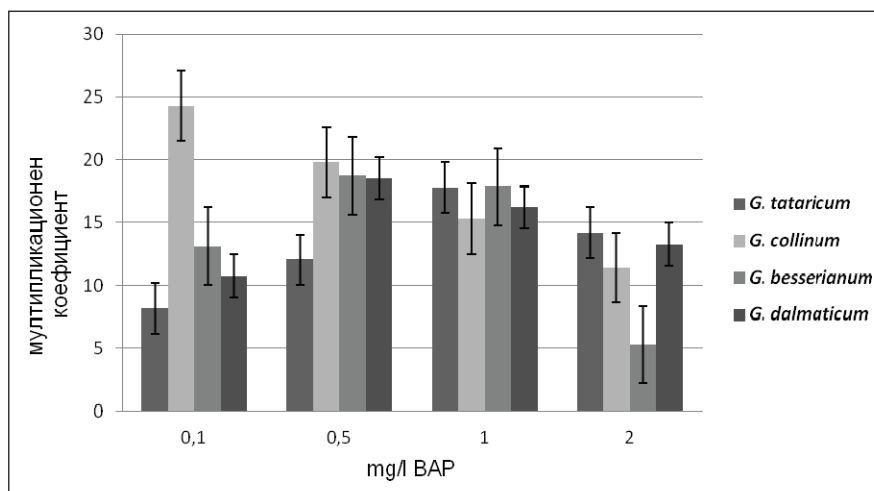
се дължи и на увеличаване на процента мултиплициралите растения – при всички видове той се вдига на 90 – 95%. (табл. 1). Това се наблюдава при *G. besserianum*, при който процентът на мултиплицираните растения при концентрацията на ВАР 0,5 mg/l и 1 mg/l нараства с 10 – 15%.

Не се отчита статистическа разлика в получените стойности на мултипликационния коефициент между отделните видове при използване на 0,5 mg/l и 1 mg/l ВАР, докато при 0,1 mg/l ВАР и 2 mg/l ВАР се наблюдава видово вариране с доказаност при \*\*\* ( $P < 0,0001$ ).

При *G. tataricum* най-висок мултипликационен коефициент се наблюдава при 1 mg/l ВАР. За *G.*

*collinum* най-подходяща се оказва концентрацията 0,1 mg/l ВАР, а при *G. besserianum* и *G. dalmaticum* – 0,5 mg/l ВАР (фиг. 2).

Нарастването на мултипликационния коефициент се дължи и на увеличаване на процента мултиплициралите растения – при всички видове той се повишава на 90 – 95% (табл. 1). Това се наблюдава при *G. besserianum*, при който процентът на мултиплицираните растения при концентрацията на ВАР 0,5 mg/l и 1 mg/l нараства с 10 – 15%. При *G. tataricum* най-висок мултипликационен коефициент се наблюдава при 1 mg/l ВАР. За *G. collinum* най-подходяща се оказва концентрацията 0,1 mg/l ВАР, а при *G. dalmaticum* – 0,5 mg/l ВАР (фиг. 1).



Фиг. 2. Влияние на различните концентрации на BAP върху мултипликационния коефициент при четири вида от род *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum* – 2 месеца  
 Fig. 2. Effect of different concentrations of BAP on the multiplication coefficient in the four species of genus *Goniolimon*: *G. dalmaticum*, *G. tataricum*, *G. collinum*, *G. besserianum* – 2 months

## ИЗВОДИ

Прилагането на пуриновия цитокинин-6-бензиламинопури (BAP) създава възможност за увеличаване на мултипликационните качества при размножаване *in vitro* на видовете от род *Goniolimon*: *G. besserianum*, *G. collinum*, *G. dalmaticum* и *G. tataricum*. Наблюдава се специфична реакция на всеки вид.

За получаване на ефективен коефициент на мултипликация, свързан с нормалното морфологично развитие и добрия жизнен статус на растенията, концентрацията на BAP може да варира от 0,1, 0,5 и 1 mg/l хранителна среда в зависимост от вида.

## ЛИТЕРАТУРА

- Витанова, Г., Протич, Н., Канински, А., Бистричанов, С., Ненчева, Д. 1999. Опазване на някои диви видове от сем. Plumbaginaceae и използването им в декоративното градинарство. Научнопрактическа конференция „Екологични проблеми на земеделието“ АГРОЕКО 99.
- Витанова, Г., Запрянова, Н., Атанасова, Б. 2003. *In vitro* размножаване, надежден метод за въвеждане и подържане на трудноразмножаващия се, застрашен от изчезване вид *Goniolimon tataricum* (Татарска змийска трева). Международна научна конференция „75 години Институт за гората“, 2, 157-159
- Георгиева, Л., Капчина-Тотева, В. М., Якимова, Е. Т. 2009. Влияние на цитокинини върху микроразмножаване на мини роза. –В: Юбилейна научна сесия с международно участие „Цветарството – традиции и предизвикателства“, с. 65-68
- Даунс, Д., Уолд, К. 1994. Защита на биологичните ресурси в България според Международното правозащитно право. Национална стратегия за опазване на биологичното разнообразие. Том 2.
- Иванова, И., Бистричанов, С., Канински, А. 2008. Проучване декоративните качества на *Goniolimon dalmaticum* (C. Presl) Reichenb. fil. Международна научна

конференция: „Българската наука и Европейското изследователско пространство“, 5-6 юни 2008 Стара Загора. Съюз на учените, Стара Загора. Електронен носител: Union Scientists-Stara Zagora, International Scientific Conference, June 5-6

Канински, А., Витанова, Г., Бистричанов, С. 2000. Декоративни качества на видовете от род *Goniolimon*. –В: IPPS in Bulgaria. Fourth Scientific Propagation of Ornamental Plants, 233-238

Ненчева, Д. 2009. Повишаване на размножителния коефициент *in vitro* на импатиенс Нова Гвинея. –В: Юбилейна научна сесия с международно участие „Цветарството – традиции и предизвикателства“, с. 73-76

Лапин, П. А. 1984. Поль интродукции в сохранении генфонда редких и исчезающих видов растений, с.198.

Bhosale, U. P., Dubhashi, S. V., Mali, N. S. and Rathod, H. P. 2011. *In vitro* shoot multiplication in different species of banana. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1, 3, 23-27

Joshi, M and Dhar, U. 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Eggew.– an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. *Plant Cell Reports*, 21, 933-939

Hsu Nai Wen, Liu Tsu Hwie, Huang, ChaoLang, Wu ReyYuh. 2000. The micropropagation of *Limonium wrightii* (Hance) O. Kuntze. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 46, 3, 277-286

Martin, C. and C. Perez. 1995. Micropropagation of five endemic species of *Limonium* from the iberian peninsula. *Journal of Horticultural Science*, 70, 97-103

Hassan, N. H., Ali, N. A. Zainudin, M. F. and Ismail, H. 2013. Effect of 6 benzylaminopurine (BAP) in different basal media on shoot multiplication of *Aquilaria hirta* and detection of essential oils in the *in vitro* shoots. *African Journal of Biotechnology*, 10, 51, 10500-10503

Tsvetkov, I. 1998. Propagation of mature specimen of mulberry (*Morus alba* L. “Pendula”) by tissue culture. IPPS in Third Scientific Conference – 3-5 October, Sofia, 129-133