

APPLICATION OF PLANT BIOTECHNOLOGY METHODS FOR THE CONSERVATION OF GENETIC RESOURCES AND FOR ACCELERATED REPRODUCTION IN THE SPECIES *Glycyrrhiza glabra* L.

Stanislava Stateva

Institute of plant genetic resources “K. Malkov”, Department “Plant genetic resources”, Sadovo, Bulgaria

Abstract: The species *Glycyrrhiza glabra* L. is a perennial herbaceous plant, distributed mainly along the Danube River. The species has disappeared in recent years, necessitating the search for maximum conservation methods. By applying the in vitro method, it is possible to preserve and maximally reproduce the species under controlled conditions. The relationship between height and number of leaves in adapted plants was investigated to determine the statistical relationship between them. The regression coefficient found a relationship between height and number of leaves in plants.

Keywords: in vitro, *Glycyrrhiza glabra* L., medicinal plants, plant propagation, conservation.

ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ НА РАСТИТЕЛНИТЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗА ОПАЗВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИ РЕСУРСИ И ЗА УСКОРЕНО РАЗМНОЖАВАНЕ ПРИ ВИДА *Glycyrrhiza glabra* L.

Станислава Статева

Институт по растителни генетични ресурси „Константин Малков“ – Садово

Резюме: Видът *Glycyrrhiza glabra* L. е многогодишно тревисто растение, разпространено предимно в поречието на река Дунав. През последните години се наблюдава изчезване на вида, което налага да се търсят методи за максимално запазване. Прилагайки in vitro метода е възможност за запазване и максимално размножение на вида в контролирани условия. Проучена е зависимостта между височината и броя листа при адаптирани растения, за да се установи каква е статистическата взаимовръзка между тях. Регресионният коефициент, установи зависимост между височината и броя листа при растенията.

Ключови думи: in vitro, *Glycyrrhiza glabra* L. медицински растения, размножаване, съхранение

Увод

Видът *Glycyrrhiza glabra* L. е многогодишно тревисто растение, разпространен предимно в поречието на река Дунав. Видът е защитен съгласно Закона за биологично разнообразие и категория “застрашен” /EN/ (Red Book of Bulgaria, 2015). Използват се корените, съдържащи главно полизахариди, флавоноиди и сапонини (Atanasova, 2004, Karkanis et al., 2018, Kumar et al., 2011).

Видът *Glycyrrhiza glabra* L. може да се размножава чрез семена и вегетативно. Получаването на оптимален брой посадъчен материал чрез семена е труден процес, което налага да се използват in vitro методите за размножаване на вида (Robeva-Davidkova, 1992).

Dimitrova et al (1994) са получили чиста култура от стъблени експланти от вида *Glycyrrhiza glabra* L. с използване на 0.3% HgCL₂ за 5 min с много добро развитие на експлантите в хранителната среда LS и MS. За получаване на чиста култура в in vitro условия се съобщава, че е използван 1% NaCl при стъблени експланти, а получените чисти култури са пренесени върху хранителна среда MS (Mareshige et al., 1995).

Видът *Glycyrrhiza glabra* L., развиващ се в хранителната среда MS с добавен ауксин ИВА от 0.2 mg/l, реагира със слабо вкореняване, а с най- добро развитие – при концентрация от 0.5 mg/l. Експлантите образуват повече корени и се развиват много по – добре (Высоцкий и др., 1976).

Експланти, развиващи се върху хранителна среда MS с участие на 1.0 mg/l IAA от *Glycyrrhiza glabra* L., са адаптирани в климатизационна камера с 90% успешно приспособяване на вида към околните условия (Thengane et al., 1998).

Целта на настоящото проучване е проследяване реакцията на вида в контролирани условия и възможностите за адаптация и отглеждане на растения от вида *Glycyrrhiza glabra* L. в района на Горнотракийската низина.

Материал и методи

Подготовката за въвеждане in vitro на растителният материал от вида *Glycyrrhiza glabra* L. започва с разделяне на едногодишни издънки (в период на активна вегетация на растенията) на сегменти с дължина 1.0 – 3.0 cm (експлантите имат една аксиларна или апикална пъпка).

Като стерилизиращ агент е изпитан живак, съдържащ разтвор в две концентрации – 0.2% HgCL₂ и експозиция от 1, 2 и 3 min.

В експеримента е изпитана основната хранителна среда –Murashige & Skoog (1962) с добавен 0.2; 0.5 и 1.0 mg/l ИВА. Опитът е заложен в три повторения с контролен вариант хранителна среда MS без добавени хормони. Като въглехидратен източник е използвана захароза (30 g/l), а за втвърдител агар (7.0 g/l) с рН на средата 5.6, а регулирането ѝ е извършено с 1N КОН преди автоклавиране. Стерилизацията се извършва за 20 min при 120°C и налягане 0.9 atm.

Развитието на микрорастенията в контролирани условия се извършва при осветление от 2000 до 3000 lx, фотопериод 14–16 часа и температура 22±24° C.

Местоположението на ИРГР „К. Малков” е на надморска височина 159 метра, северна ширина 42°-9, източна дължина 24°-57. Територията е с изразен континентален климат-топло лято и студена зима.

Опитно поле с размер 100 m² се създаде в ИРГР „К. Малков”, гр. Садово. Основната обработка на почвата е дълбоката 26–30 cm оран, брануване и последващо култивиране до степен рохкавост.

Районът на Горно-Тракийската низина се отличава с много добри екологични условия, които осигуряват високи и постоянни добиви на отглежданите култури. Почвата в района е ливадно-канелена смолницоподобна с рН-7,84. Метеорологичната характеристика на района е със средна температура +12,4° C, максимална стойност за месец юли +30,8°С и минимална за месец януари -3,2°С. Средното количество дъжд е 410 l/m².

Изнасянето на адаптираните растения при полски условия стартира през месец май на предварително оформена площ.

Посадъчният материал се нарежда в браздите на на 70 cm разстояние, с дълбочина 20 cm и 40 cm един от друг, като разсадът се поставя изправен, а коренищата – легнали. Засипват се със 7–8 cm пръст.

Грижите за насажденията по време на вегетацията се свеждат до поддържане на рохкава, добре овлажнена и изчистина от плевели почва. Борбата с плевели се извършва ръчно на всеки 4 седмици. Напоиването се осъществява посредством гравитиране на всеки 7 дни.

Отчетени показатели са:

- Височина на растенията
- Брой листа

Наблюденията върху растежа и развитието на растенията се извършват всеки 10 дни. Данните са обработени с SPSS 16.

Резултати и обсъждане

При стерилизацията на вида *Glycyrrhiza glabra* L., за 1, 2 и 3 min в 0.2% разтвор на HgCL₂ се установява следната зависимост – с увеличаване на експозицията се увеличава и броят на развити експланти.

Максимален брой получени стерилни експланти се наблюдава при 1 min в 0.2 % HgCL₂. В експозиции от 2 и 3 min в стерилизиращият агент се наблюдава най-голямо количество от замърсени и непреливи стерилизационната процедура експланти. Тъй като, стерилизирането на видове, събрани от естествените им находища, се оказва нелека задача, получаването на единични здрави експланти се приема за успех.

Развитието на експлантите се проследи в хранителна среда Murashige & Skoog (1962) с добавяне на ауксина IBA.

Нарастването на стъблото при медицинския вид *Glycyrrhiza glabra* L. в контролирани условия, с добавяне на 0.2 mg/l IBA, на 10-я ден от залагане на опита достига =0.54 cm, а за контролния вариант = 0.5 cm, стойност, надвишаваща вариантите с участието на 0.5 и 1.0 mg/l IBA. За 20-я и 30-я ден от развитието на експлантите се отчитат приблизително еднакви стойности за "височина", близки до контролния вариант. Коефициентът на мултипликация за вида е 1:5, а за контролния вариант е 1:6.

Развитието на експлантите в концентрация на ауксина от 0.5 mg/l на 10-я ден от залагане на експеримента за измерването на "височина" е с най-ниски стойности в опита от = 0.48 cm. С увеличаване периода на наблюдение при вида *Glycyrrhiza glabra* L. се отчитат показатели за височина с = 1.02 cm и = 1.29 cm.

Стойността, която заема средата на статистическият ред, медианата, прави изключение, като за 20-я и 30-я ден отбелязва приблизително еднакви показатели с Me=1.2 cm. В концентрация от 0.5 mg/l IBA коефициентът на пролиферация е 1:4.

В началния етап от развитието на експлантите в хранителна среда, с участие на 1.0 mg/l IBA, нарастването на стъблото е с показатели, близки до контролата. При проследяване реакцията на вида се констатира, че има различни растежни прояви в периода на наблюдение (Фиг. 1). На 30-я ден във варианта с участие на 1.0 mg/l IBA са измерени максимални показатели – = 1.32 cm спрямо тези за същия период на контролния вариант – = 1.45 cm. Коефициентът на пролиферация за този вариант е 1:4.

Сравнявайки трите варианта с участието на ауксина с контролния вариант, се открие концентрация от 0.2 mg/l IBA с най-висок показател на развитие на 20-я ден от залагането на опита.

Спазени са установените в растениевъдната практика правила (начин на залагане, засаждане, торене, грижа през вегетацията). След изнасяне на полето не се наблюдаваха загинали растения причинено от условията на околната среда.

Проведените фенологични наблюдения месеците май-август констатира много добро биологично и ботаническо състояние. Развитието на *Glycyrrhiza glabra* L. продължи за целият период .

Проучена е зависимостта между височината и броя листа с цел да се установи каква е статистическата взаимовръзка между тях. Регресионният коефициент, при който се изучават и оценяват възможните функционални зависимости между две или повече величини, установи зависимост между височината и броя листа при растенията.

Методът на изследване на зависимостта между височината и броя листа (табл. 1) е адекватен със степен на значимост е (коефициентът на Fisher F= 180.25).



Фиг. 1. Двадесет дневни растения от вида *Glycyrrhiza glabra* L.

Таблица 1.

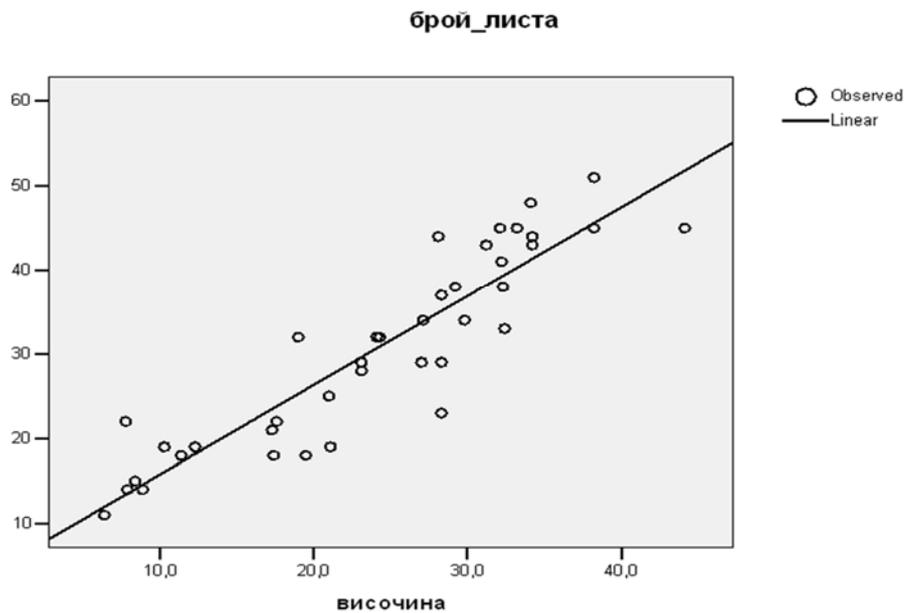
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	4197.992	1	4197.992	180.256	.000
Residual	884.983	38	23.289		
Total	5082.975	39			

Регресионният анализ на данните потвърждава високата зависимост от височината на растенията и броя листа. Тя се описва с уравнението:

Наличие е силна връзка, че с нарастване на стъблото пропорционално нараства и броят листа при вида *Glycyrrhiza glabra* L.

Това се потвърждава и от коефициента на корелация ($R = 0.909 > 0.7$), който показва, че между променливите съществува много силна корелационна зависимост.

Коефициентът на детерминация е . Следователно 82.6% от изменението на броя на листата зависи от фактора височина. Останалите 17.4% от изменението при вида *Glycyrrhiza glabra* L. на височина се дължат на други фактори. Тази корелационна зависимост е представена графично на фигура 2.



Фиг. 2. Корелационна зависимост между височината на растенията и броя листа при *Glycyrrhiza glabra* L.

През вегетационния период не се наблюдава развитие на болести и неприятели.

Медицинският вид *Glycyrrhiza glabra* L. има добра пластичност към околната среда. Създадено е експериментално насаждение от in vitro размножени растения на територията на ИРГР „Константин Малков“ град Садово.



Фиг. 3. Адаптирани растения от вида *Glycyrrhiza glabra* L.

Изводи

1. Най-добро развитие на вида *Glycyrrhiza glabra* L. в контролирани условия се наблюдава в хранителна среда Murashige & Skoog (1962) с добавен 0.2 mg/l ИВА
2. Налице е с висока стойност на корелационна зависимост между височината и броя на листата на растенията от вида *Glycyrrhiza glabra* L.
3. Създадено е експериментално насаждение от in vitro размножени растения *Glycyrrhiza glabra* L. на територията на ИРГР „Константин Малков“ град Садово.

Литература

1. Висоцкий В. А., В. Г. Трушечкин (1976), Регенерация изолированных меристематических верхушек древесных растений. Плодоводство и ягодоводство нечерноземной полосе, т. 9, М. 89-100.
2. Atanasova, M., N. Nedkov, (2004), Essential oil and medicinal crops, Sofia, 287 (Bg).
3. Dimitrova D., K. Varbanova, Y. Peeva (1994), A study on in vitro cultivation of *Glycyrrhiza glabra*, Plant Genetic Resource Newsletter, 100, p. 12-13.
4. Karkanis A., Martins, N., Petropolis S., Ferrera I., 2018, Phytochemical composition, health effects, and crop management of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.): A medicinal plant., Food Reviews International, 2018, Vol. 34 Issue 2, p. 182-203.
5. Kumar A., Jyotsha D., 2011, Review on *Glycyrrhiza glabra* L. .J. Pharmac, Scientific Innovation, 1 (2):1-4.
6. Mareshige K., H. Kohda, N. Tani, K. Ashida, M. Sugino, A. Yamamoto, T. Horikoshi (1995), In vitro propagation from Axillary Buds of *Glycyrrhiza glabra* L., Plant Tissue Culture Letters, 12(2), 145-149.
7. Robeva-Davidova P., Gyuleva V., Atanassov A., 1992, In vitro propagation of *Glycyrrhiza glabra* L. through shoot tip explant culture and glycyrrhizin detection, Intern. Prod. Radiance, 4, 358.
8. Thengane S. R., D. K. Kulkarni, K.V. Krishnamurthy (1998), Micropropagation of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Through Shoot Tip and Nodal Cultures, Society for In Vitro Biology.
9. The Red Book of Bulgaria, 2005 г., 512.