

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И
ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

ТЕОДОРА АНГЕЛОВА ИВАНОВА

In vitro култивиране на
Ruscus aculeatus L. и *Ruscus hypoglossum* L.
(*Liliaceae*)

Автореферат

на дисертация
за получаване на образователна и научна степен „доктор”

Научна специалност
01. 06. 03. Ботаника

Научен ръководител: доц. д-р Татяна Димова Стоева
Научен консултант: проф. дмн Стефан Димитров Николов

София 2012

Дисертационният труд съдържа 101 страници, включително 5 таблици и 35 фигури. Цитираната литература включва 233 заглавия, от които 9 на кирилица и 224 на латиница. Представени са 3 приложения с 16 оригинални снимки, 6 фигури и допълнителен CD с илюстрации.

Дисертацията е разработена в рамките на редовна доктурантура в Отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси” към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2013 г. от часа в заседателната зала на База 3 на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН на ул. „Акад. Г. Бончев”, бл.23 на открито заседание на петчленно Научно жури (назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ – БАН № 298/18.12.2012) в състав:

доц. д-р Владимир Вълчев (ИБЕИ-БАН) - председател
проф. д-р Йорданка Иванова (пенсионер) - рецензент
проф. Венета Капчина (СУ-БФ) - рецензент
доц. д-р Милка Милева (И-т по Микробиология-БАН)
доц. д-р Татяна Стоева (ИБЕИ-БАН) - научен ръководител

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в Библиотеката на ИБЕИ-БАН на ул. „Акад. Г. Бончев”, бл.23, ет. 4, ст. 402

Увод

Биотехнологичните подходи са от особено важно значение при отглеждането на културни и диви видове, които имат бавен растеж в природата, а семенното им размножаване е ограничено или се наблюдава разпад на желаните белези (Drew, 1997; Jain & Ishii, 2003). *In vitro* методите, като дял от *ex situ* практиките се смятат за ценно допълнение към *in situ* опазването, което е отразено в Конвенцията за биологичното разнообразие (1992) и актуализираната Глобална стратегия за опазване на растенията (2011-2020). *In vitro* поддържане и култивиране на ДНК, тъкани и цели растения при контролирани условия е особено важно за видове, при които останалите методи за консервация не са надеждни или изискват твърде много усилия и инвестиции (Benson, 1999; Sarasan et al., 2006; Ashmore et al., 2007; Reed et al., 2011).

Ruscus aculeatus L. (бодлив залист) и *R. hypoglossum* L. (подезичен залист) са видове с голямо икономическо значение, като се употребяват всички части на растенията. И двата вида са ценни с декоративните си качества – вечнозелените надземни части са широко използвани при аранжировки на букети и цветни украси, растенията са атрактивни за саксийно и градинско отглеждане, особено в композиции на засенчени участъци. *R. aculeatus* е лечебно растение, известно от древността – корените и коренището са източник на стероидни сапонини (рускогенини), прилагани във фитотерапията и козметиката за подобряване на състоянието на кръвоносната система. *R. aculeatus* е познат като хранително растение в някои европейски държави.

Суровината, както за фармацевтичното производство от *R. aculeatus*, така и надземните части с декоративно приложение, се събира от естествените находища. Продължителната им свръхексплоатация е довела до заплахата от изчезване на някои от естествените популации на двата вида в някои европейски страни и Турция (Lange, 1998; Coşgun et al., 2006; Karlović, 2009). Възстановяването на находищата е продължителен процес, определящ се от бавното нарастване на растенията. Необходимо са минимум 5 години за възстановяване при условие, че са запазени достатъчен брой възрастни индивиди (Асенов и др., 1990). На международно ниво двата вида са обект на Директива 92/43/ЕЕС, 1992 (Приложение V(b)) и Препоръка № 49 (Бернска конвенция,

1996), свързани с защитата на диви растителни видове, които са обект на експлоатация и търговия. В България двата вида са под регулирано ползване (Закона за биологичното разнообразие, 2002), а *R. aculeatus* е включен в Закона за лечебните растения (2000).

Специфичните изисквания към условията за култивиране (сциофити, мезоксерофити, термофити) са причина за рядкото отглеждане на двата вида в култура. Биотехнологичните подходи за култивиране на *R. aculeatus* и *R. hypoglossum* са свързани с осигуряване на размножителен материал, за получаване на рускогенини и с консервационна цел (Zhong et al., 2000; Luz et al., 2004; Abou Dahab, 2005a, b; Balica et al., 2005, 2007; Moyano et al., 2006, Vanciu et al., 2007). Проучванията са сравнително нови, публикуваните резултатите са често противоречиви и регистрират затрудненията в работата с двата обекта, вследствие на бавното нарастване на културите и ниския размножителен коефициент. Неизяснени са редица теоретични и технологични аспекти при *in vitro* култивирането на двата вида.

Цел и задачи

Цел на изследването е, чрез прилагане на биотехнологични подходи да се инициират *in vitro* култури от *Ruscus aculeatus* и *R. hypoglossum* с донорен материал от естествените популации в България и да се проучват възможностите за *in vitro* микроразмножаване и консервация на двата вида.

За изпълнение на така формулираната цел бяха поставени следните научни задачи:

1. Инициране на *in vitro* култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum* с донорен материал (семена и вегетативни експлант) от български произходи.
2. Изследване влиянието на фактори на хранителната среда (тип среда, растежни регулатори, съдържание на захароза) при *in vitro* микроразмножаването на двата вида.
3. Адаптация *ex vitro* на получените растения в нестерилни условия.
4. Проучване на възможностите за *in vitro* консервация на култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*.

5. Цитометрично и биохимично (изоензимно) характеризиране на получените *in vitro* клонове от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*
6. Фитохимичен скрининг на *in vitro* култури от *R. aculeatus* за съдържание, локализация на стероидни сапонини (рускогенини).

Материал и методи

Растителният материал (зрели плодове и цели растения) от *Ruscus aculeatus* и *R. hypoglossum* е събиран в периода 2005-2009 г. от естествените популации на двата вида на територията на България, съответно 7 произхода от *R. aculeatus* и 6 от *R. hypoglossum*.

При всички експериментите са използвани **агарови, течни или двуфазни хранителни среди** на основата на MS (Murashige & Skoog, 1962) с модифицирани витамини с 10-кратно увеличено съдържание на тиамин-HCl. Използвани растежни регулатори: 2,4-D, NAA, IBA, BAP, KIN, TDZ и PAC. Прилагани са в концентрации от 0-4 mg/l според конкретния експеримент. За въглероден източник е използвана техническа захароза в концентрация 0-90g/l. При двуфазно култивиране за основа е използван 125 ml воден агар с добавяне на 20 ml течна среда след полимеризиране. Всички хранителни среди се коригират до pH 5.75-5.8 с 1N NaOH или 1N HCl преди стерилизация и са автоклавираны при 1 atm за 20 min.

За иницирирането на *in vitro* култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum* са тествани семена, изолирани зародиши и вегетативни части (коренищни пъпки, филокладии и клонки). За основната стерилизация са използвани търговски препарати дезинфектанти Domestos® и Izosan®-G. Покълването на семената е проведено на воден агар с или без GA3, а зародишите и вегетативните експланты са залагани на хранителна среда MS с 2,4-D, NAA и BAP. Инициалното размножаване на *R. aculeatus* чрез директна регенерация е тествано на агарова MS среда с 0.5 mg/l NAA и 1 mg/l BAP. Динамиката на размножаване на клоновете е представена като брой растения в култура, получени от един експлант за срок от 18 месеца. При *R. hypoglossum* клоновете са размножени чрез индиректна регенерация през калус. Инициалните култури са сравнени на агарова MS среда с TDZ (0.5 mg/l) за срок от 1 година.

Експерименталната схема за оценка на факторите на средата върху микроразмножаването и съхранението на културите от *R. aculeatus* е показана в таблицата.

Експеримент	Растежни регулатори	Концентрация на захарозата, g/l	Хранителна среда	Срок на отчитане	Отчитани показатели
Претретиране с течна хранителна среда	NAA	30	течна	1 мес.	1, 2
	NAA, BAP	30	агарова	2 x 2 мес.	1, 2, 4
Влияние на кинетин и тидиазурон	KIN TDZ	15	агарова	2 мес.	1, 2, 3
Влияние на захарозата	-	15, 30, 60, 90	агарова	2 мес.	1, 2, 3, 4
Двуфазно култивиране	NAA, BAP, PAC	30	агарова, двуфазна	2 мес.	1, 2, 3, 4
Ефект на паклобутразола	PAC	30	агарова	2 мес.	1, 2, 3, 4
Съхранение на <i>in vitro</i> култури	NAA	30	агарова, двуфазна	16 мес.	5
Регенерационна способност на култури, съхранявани в двуфазна среда	Kin, TDZ BAP, NAA 2,4-D, IBA	30	агарова	1 мес.	1, 2, 3, 4

Оценявани са следните показатели:

- Регенерационна способност** – брой експланти, при които се отчита развитие на нови издънки, [%].
- Размножителен коефициент** – среден брой издънки на експлант.
- Растеж** – средна височина на издънките [cm].
- Вкореняване** – брой вкоренени растения или брой корени на експлант, [%].
- Преживяемост** – брой култури (кълъстери от издънки), запазили жизненост след съхранение 16 месеца в двуфазна среда, [%].

При претретиране с течна хранителна среда, за стимулиране развитието от *in vitro* получените растения са изолирани коренищни експланти, култивирани без разбъркване за 1 месец, след което са прехвърлени на агарови среди.

Влиянието на растежни регулатори върху развитието на калусни култури и индиректната регенерация на издънки при *R. hypoglossum* (клон Вър3) е тествано на хранителни среди със следните растежни регулатори:

Растежен регулатор/ Концентрация, mg/l			
NAA	BAP	TDZ	KIN
			0,50
			1,00
		0,20	
		0,50	
	0,50		
0,50	1,00		
1,00			0,50
1,00		0,50	

Отчитани са показателите: среден брой издънки на експлант, калусообразуване, вариации в морфологията и некрозиране на експлантите, като последните три са отчитани по скала: - липса на калусообразуване/ вариации/ некроза; + по-малко от $\frac{1}{4}$ от експлантите с калусообразуване/ вариации/ некроза; ++ до $\frac{1}{2}$ от експлантите с калусообразуване/ вариации/ некроза; +++ повече от $\frac{2}{3}$ от експлантите с калусообразуване/ вариации/ некроза.

Влиянието на концентрацията на захарозата върху жизнените показатели и морфогенетичните характеристики на калусни култури (клон Вър3) е тествано на среда без растежни регулатори в концентрации 15, 30, 60, 90 g/l. Отчитани са показателите: регенерационна способност (%), Размножителен коефициент (среден брой издънки на експлант); калусообразуване (%), растежен индекс (*GI*), криспатни издънки (%), витрифицирани издънки (%), некрозирани експлантите (%).

Растежният индекс на калусните култури е изчисляван по следната формула:

$$GI = (FW_2 - FW_1) / FW_1$$

FW – свежо тегло (g); FW₁ – начална биомаса; FW₂ – крайна биомаса.

Условия на култивиране

Култивирането на семената, зародишите и експлантите е осъществено при температура 24±1°C и 16/8 часа фотопериод при осветяване 1500 lux (45 mmol·m⁻²·s⁻¹). Съхранение на културите от *R. aculeatus* е проведено паралелно при 15±1 в агарови и при 24±1°C в агарови и двуфазни среди.

За адаптация *ex vitro* са заложени спонтанно вкоренени растенията, без разделяне на клъстерите, регенерантите са засаджани и изнасяни при нестерилни условия.

Цитометричното характеризиране е проведено чрез определяне количеството на ДНК, като е използван протокол на фирмата производител (Partec). За вътрешни стандарти при измерванията са използвани *P. sativum* за *R. aculeatus* и *S. pseudocapsicum* за *R. hypoglossum*. За оценка влиянието на растежните регулатори върху съдържанието на ДНК са анализирани филокладии от напълно регенерирани растения от *R. aculeatus* (клон Свр12), получени на MS среда без регулатори (контрола) и с BAP:NAA (1:0.5 mg/l), BAP (0.2 mg/l), KIN (0.5, 1, 2, 4 mg/l), TDZ (0.2, 0.4, 0.5, 1, mg/l), PAC (1, 2, 4 mg/l). За оценка влиянието на произхода са сравнявани напълно регенерирани растения от клонове Вел0, Вел133, МД1, Свр12, Свр28, Свр 33, Свр52 на *R. aculeatus*, получени на среда с BAP (0.2 mg/l). При *R. hypoglossum* са сравнени регенеранти и калус от трите клона – См, Вър1, Вър3. Контроли са нативни растения.Получените резултати са осреднени и количеството ДНК е представено в pg (2С).

Изоензимните профили на пероксидаза (POD), естераза (EST) и кисела фосфатаза (AP) на регенеранти от *R. aculeatus* и регенеранти и калус от *R. hypoglossum* са сравнени чрез полиакриламидна гел електрофореза (PAGE). Анодните изоформи на трите ензима са определени в модифицирана Tris-глицин прекъснатата буферна система На всяка изоформа е давана числова стойност, съответстваща на миграцията ѝ в гела от старта.

Съдържанието на рускогенини в *in vitro* култури от *R. aculeatus* е определено чрез обратно-фазова високо ефективна течна хроматография (HPLC) в градиентен режим на елуиране. За сравнителен анализ на съдържанието на рускогенини в *in vitro* клоновете от *R. aculeatus* са изследвани поне по 30 клъстера от клонове Вел0, Вел133, МД1, МД9, Свр12, Свр28, Свр33, Свр52. За свидетели са използвани стандартни чисти вещества: рускогенин, неорускогенин, русцин и десглюкорусцин

Статистическа обработка на данните е направена чрез вариационен анализ ANOVA и post-hoc групиране по хомогенност на вариантите чрез Duncan Multiple Range Test (DMRT) ($P \leq 0.05$) чрез статистически софтуер SPSS® 19.

Резултати и обсъждане

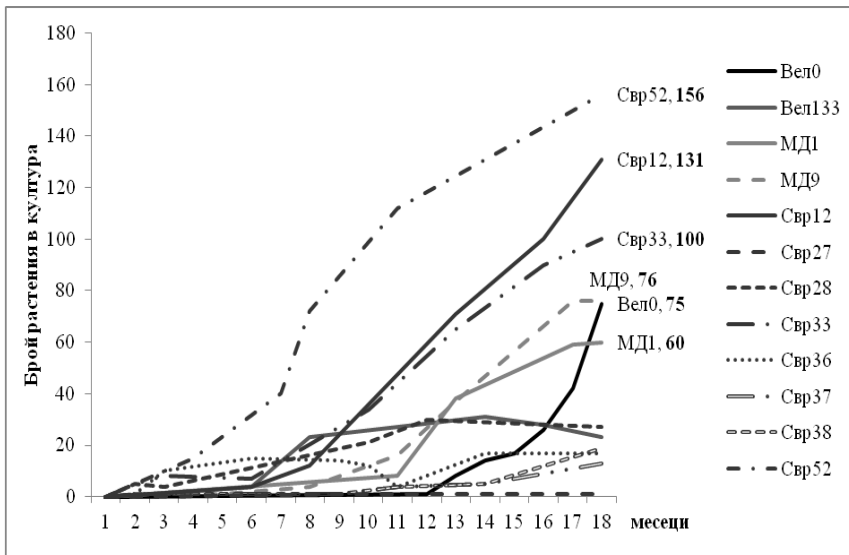
1. Инициране на *in vitro* култури от *Ruscus aculeatus* и *R. hypoglossum*

И двата използвани дезинфектанта – Domestos® и Izosan®-G демонстрираха 100% ефективност. Иницирането на култури от семена на *R. aculeatus* беше обусловено от характерните за вида бавно и неравномерно покълване. Покълването на семената е продължителен процес - 10 до 12 месец. Третирането с GA3 с цел прекъсване на покоя и ускоряване на покълването не показва позитивен ефект. При *R. hypoglossum* процесът на покълване е по-бавен от този на *R. aculeatus* – покълване се наблюдава от 18-24 месец след залагане. Единствените три успешно размножени *in vitro* клона са получени от семена, събрани след доузряване в оранжерия (варианти 7 и 8), заложи на среда с GA3. При *R. aculeatus* култивирането на изолирани зародиши съкрати времето за покълване до два месеца. Като цяло кълняемостта им не е висока – до 15%. При *R. hypoglossum* изолирането на цели зародиши е почти невъзможно поради по-голямата крехкост и оводненост на някои от зародишите. При наличие на малък брой семена тази техника не е препоръчителна, поради високия риск от случайно нараняване на зародишите. Въпреки, че са използвани млади издънки и е постигната 100% стерилизация, вегетативните експланти не показват регенерационна способност при култивиране повече от половин година. При използване на коренищни експланти основен недостатък се оказва високата заразеност на експлантите. Работата по микроразмножаването продължи само с използване на коренищни експланти от получените *in vitro* семеначета. От *Ruscus aculeatus* бяха получени 12 клона от 4 произхода: от Странджа - Вел0, Вел133, МД1, МД9; от Стара планина – Свр R12, Свр 27, Свр28, Свр33, Свр, 36, Свр37, Свр38, Свр52. От *Ruscus hypoglossum* бяха получени 3 клона от 2 произхода от Източна Стара планина – СМ, Вър 1, Вър 2.

2. Инициално размножаване на семенни клонове от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*

Резултатите показват значително вариране в динамиката на размножаване между отделните клонове (Фиг. 1).

Фиг. 1. Динамика на размножаване на клонове от *R. aculeatus*

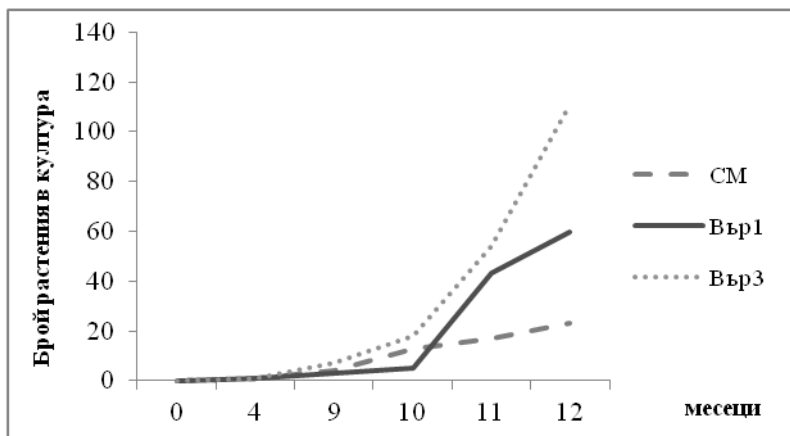


Клонове Свр52, Свр12, Свр33, МД9, МД1 и Вел0 се увеличават експоненциално, като с най-бързо и най-голямо нарастване се отличава клон Свр52 (156 растения от 1 експлант), а при останалите се наблюдава 6 до 12 месеца lag-фаза. При всички клонове от *R. aculeatus* младите издънки се развиват директно върху повърхността на коренищните експланти в клъстери, без да се наблюдава дедиференциация. Калусообразуване почти отсъства и се наблюдава предимно по наранени тъкани и на места, където са правени прерези. Полученият калус е компактен, зелен и регенерираше издънки или корени (по-често) само при застаряване на културата. В морфологично отношение всички регенерирани издънки са нормално развити, с разклонени или неразклонени стъбла и различна форма на филокладиите.

Културите при *R. hypoglossum* се получават чрез индиректна органогенеза през калус, развиват се бавно с дълга lag-фаза от 10 месеца (Фиг. 2). Най-значително нараства клон Вър3 – 111 растения, получени за 1 година, следван от Вър1 – 60 и СМ – 23. Наблюдават се отклонения в морфологията на издънките: прекомерно израстване, деформирани филокладии и стъбла, криспатни структури, каквото не е отчитано преди в култури от *Ruscus*. Регистрирано е развитие на цветове (единични и в съцветия

по 3-4) с произволно разположението – в центъра или края на филокладиите, с или без развитие на характерния прицветник.

Фиг.2. Динамика на размножаване на клонове от *R. hypoglossum*.



3. Влияние на фактори на средата върху микро-размножаването на *R. aculeatus*

3.1. Претретиране с течна хранителна среда

В резултат на претретирането за един месец се формираха от 10 до 30 пъпки на експлант, който размножителен коефициент е по-висок от максималния съобщаван досега в литературата. Култивирането на *R. aculeatus* в течна хранителна среда е продуктивно не повече от един месец, тъй като постепенно експлантите спират да произвеждат нови пъпки. След субкултивиране на агарови среди се наблюдава развитие при 65-100% от експлантите (фиг. 3). Наличието на NAA и ВАР в средата е статистически значим фактор за развитието на по-голям брой издънки. Наблюдава се пропорционална зависимост между увеличаването на концентрацията на NAA в средата и броя на регенерантите. Най-ефективна за регенерацията е средата само с 2 mg/l NAA.

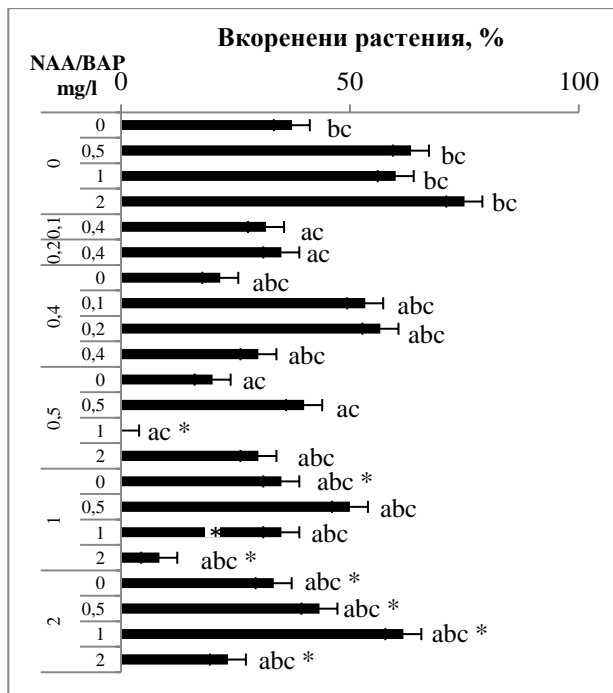
Фиг. 3. Регенерационна способност и размножителен коефициент на коренищни експланти от *R. aculeatus* след претретиране с течна среда



Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT). Празните стълбчета показват култури с хлоротични изменения

Кумулативно комбинацията от претретиране с течна хранителна среда и субкултивиране на агарова среда при директна регенерация на издънки дава по-добри резултати от индиректната регенерация, съобщена от други автори. Растенията развиват корени на почти всички среди (фиг. 4). По-ефективни за коренообразуването са вариантите на среди, съдържащи само или повече (1 и 2 mg/l) BAP, а високите концентрации на NAA (1 и 2 mg/l) стимулират нарастването на коренище.

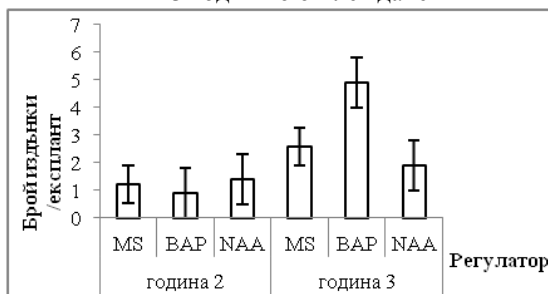
Фиг. 4. Вкореняване на регенеранти от *R. aculeatus* на среди с NAA и BAP



Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT). *Третирания, при които се наблюдава нарастване на коренище

Допълнително в хода на изследванията е отчетено, че ефективността на третиранията с NAA и BAP се променят при продължително култивиране – 2 и 3 години (фиг. 5).

Фиг. 5. Размножителна способност на *in vitro* култури от *R. aculeatus* след 2 и 3 годишно отглеждане



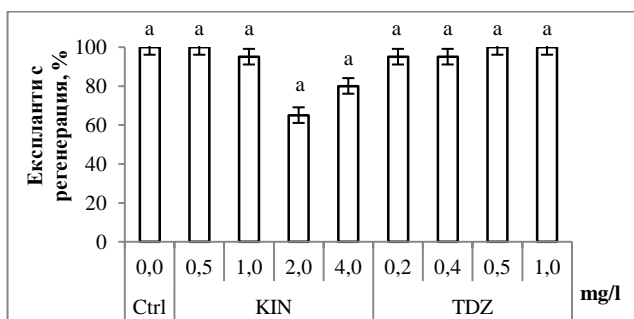
Стойностите са показани \pm SE.

В контролната среда, без регулатори и с NAA, от втората до третата година размножителният коефициент нараства два пъти, а при ВАР – над 4 път, което перспективно за продължително микроразмножаване на вида *in vitro*.

3.2. Влияние на кинетин и тидиазурон

Процентът на експлант с регенерация в почти всички третирания с KIN и TDZ е 70-100% (Фиг. 6). При отделни издънки при ниските концентрации на TDZ (0.2 и 0.4 mg/l) се наблюдават морфологични изменения на филокладиите и директна органогенеза на нови издънки директно върху обвивните люспи на надземните стъбла, които могат да се отделят и култивират самостоятелно.

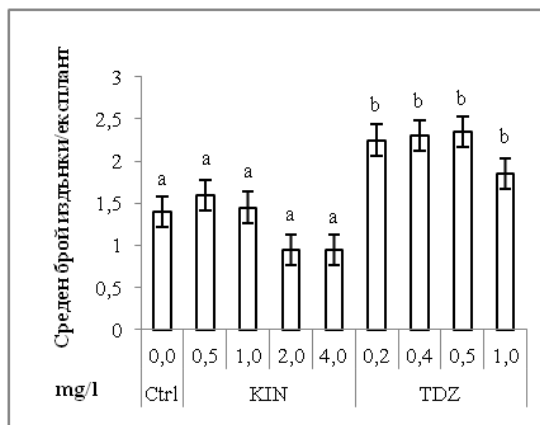
Фиг. 6. Регенерационна способност на коренищни експлант от *R. aculeatus* на агарови среди с кинетин и тидиазурон



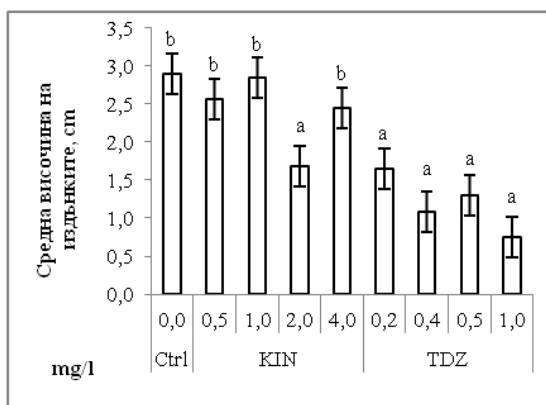
Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

Тидиазуронът стимулира развитие на двойно по-голям брой издънки в сравнение с кинетина, независимо от концентрацията (фиг. 7). Издънките получени на контролната среда без регулатори и третираните с кинетин са значително по-израстнали от тези на средите с тидиазурон (Фиг. 8). Тидиазуронът предизвиква развитие на значително по-ниски издънки с размери 0.8-1.7 cm, като не се отчита развитие на витрифицирани растения.

Фиг. 7. Размножителен коефициент на коренищни експланти от *R. aculeatus* на среди с KIN и TDZ



Фиг. 8. Растеж на издънки от *R. aculeatus* на агарови среди с KIN и TDZ



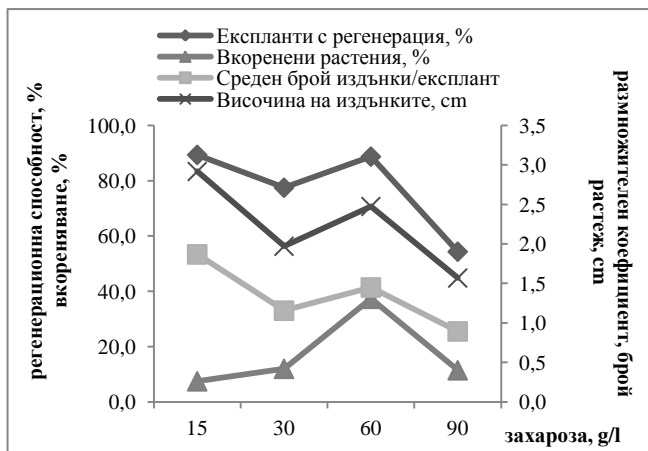
Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0,05$, DMRT)

3.3. Влияние на захарозата

При *R. aculeatus* влиянието на концентрацията на захарозата върху регенерационната способност на културите е показана на фиг. 9. Регенерационната способност на експлантите варира минимално (78-89%) в диапазона 15-60 g/l захароза и значително спада при най-високата концентрация (90 g/l). Размножителният коефициент и растежът са максимални при най-ниската

концентрация на захарозата (15 g/l) При *R. aculeatus* използването на 15 g/l захароза осигурява по-голям брой регенеранти и по-малък брой вкоренени растения на среди без растежни регулатори.

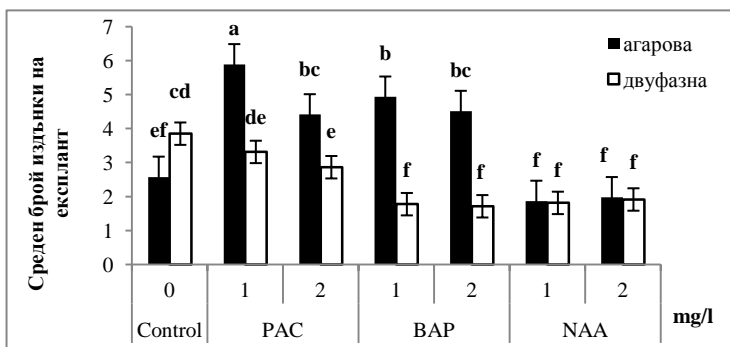
Фиг. 9. Влияние на концентрацията на захароза върху регенерацията, размножаването, растежа и вкореняването на култури от *R. aculeatus*



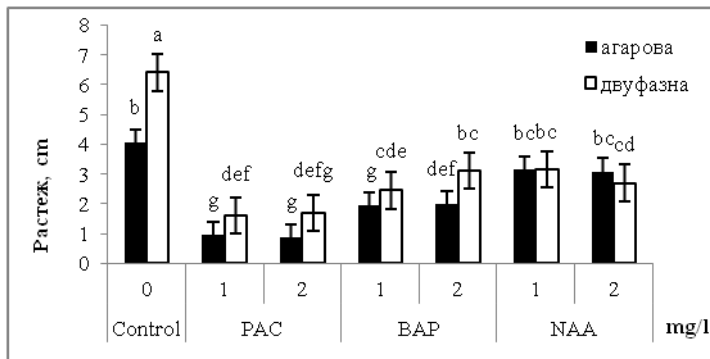
3.4. Двухазно култивиране

Двухазното култивиране е разработено като подход за избягване на негативния ефект при претретиране в течна хранителна среда (Фиг. 10-12). Най-висок е размножителният коефициент при средите с PAC, както при полу-потопените така и при агаровите култури.

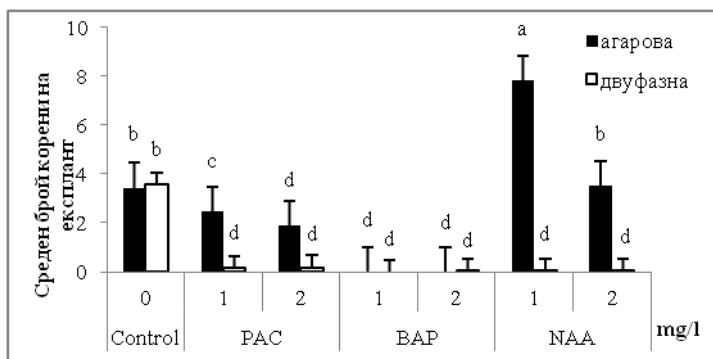
Фиг. 10. Размножителен коефициент на коренищни експлант от *R. aculeatus* на агарова и двухазна среда



Фиг. 11. Растеж на регенерираните издънки от *R. aculeatus* на агарова и двуфазна среда



Фиг.12. Вкореняване на експлантите от *R. aculeatus* на агарова и двуфазна среда

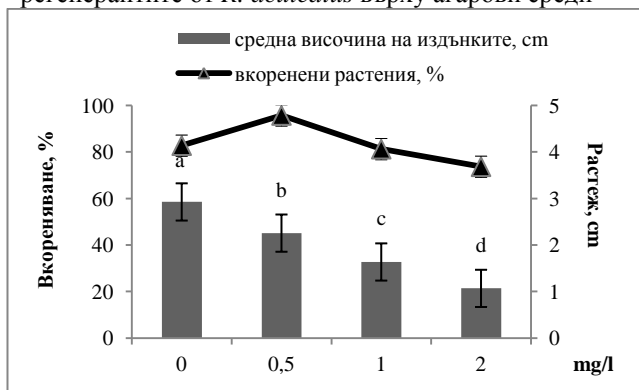


Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

3.3.5. Ефект на използването на ретардант (паклобутразол) в агарови култури

Получените растения на среди с PAC са морфологично нормални, като увеличаването на концентрацията на паклобутразола предизвиква значително скъсяване на издънките без да се повлиява размера и формата на филокладиите. Коренообразуването е обилно, което позволява директно адаптиране в субстрат с висок процент преживяемост, в сравнение с тези отглеждани на среди с BAP и NAA (табл. 13).

Фиг. 13. Влиянието на PAC върху вкореняването и растежа на регенерантите от *R. aculeatus* върху агарови среди

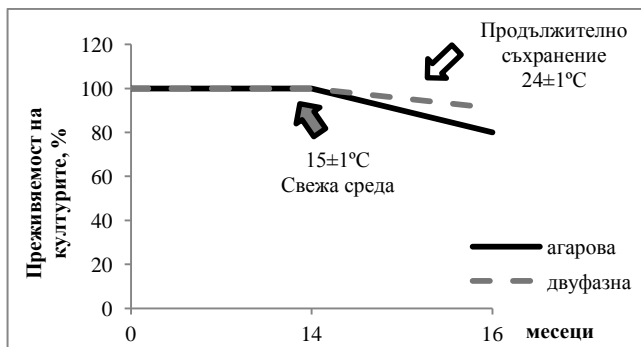


Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

3.6. Съхранение на *in vitro* микроразмножени култури от *R. aculeatus*

Двуфазното култивиране осигури до $91 \pm 7\%$ преживяване на културите, без съществени загуби от контаминация и понижаване на жизнеността. Максималното съхранение на агарова среда при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ е шест месеца, след което се налага културите да се прехвърлят на нова среда (фиг. 14).

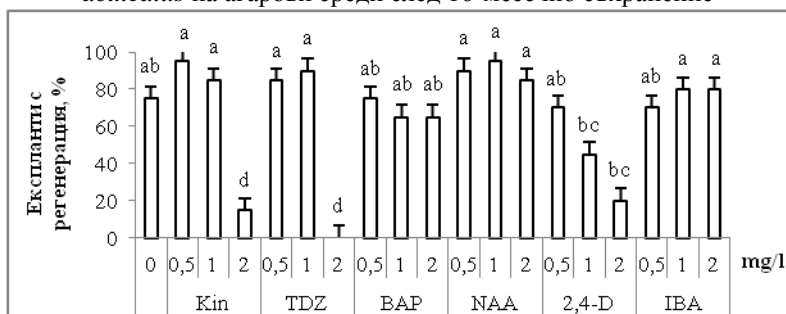
Фиг. 14. Преживяемост на *in vitro* култури от *R. aculeatus* при съхранение



Регенерационната способност на коренищни експланти, получени от растения, съхранявани в двуфазна култура 16 месеца, е тествана на 19 среди с различни регулатори (фиг. 15). Високите концентрации на KIN и 2,4-D значително потискат регенерацията

(съответно 15 и 20%), като TDZ 2 mg/l напълно я възпрепятства. Като изключим 2,4-D и високите концентрации на TDZ и KIN, всички останали варианти са статистически неразличими помежду си и от контролата.

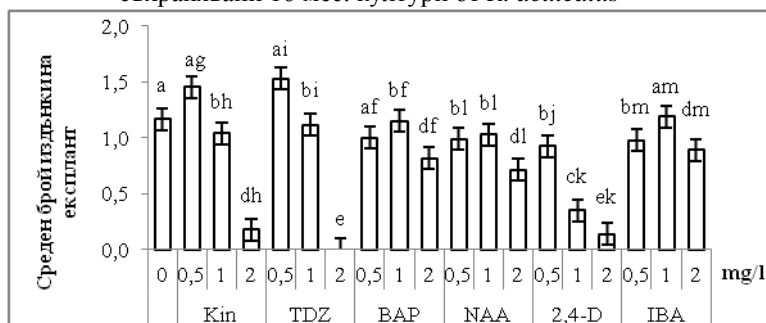
Фиг. 15. Регенерационна способност на съхранявани *in vitro* култури от *R. aculeatus* на агарови среди след 16-месечно съхранение



Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

Най-добри резултати за размножителния коефициент са получени на средите с 0.5 mg/l TDZ и 0.5 mg/l KIN. Негативно повлияване е отчетено отново при високите концентрации на KIN, TDZ и 2,4-D (фиг. 16).

Фиг. 16. Размножителен коефициент на коренищни експлант от съхранявани 16 мес. култури от *R. aculeatus*

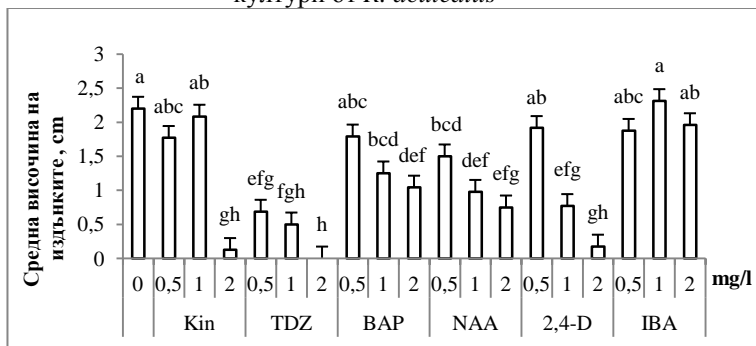


Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

Регенерацията на нови издънки при средите с цитокинини е отчетена на втората седмица след рекултивирането – почти два пъти по-бързо от тези с ауксини.

Регенерантите от всички третирания развиват издънки с 3-4 филокладии, като растежът на културите се повлиява значително от вида и концентрацията на регулаторите (фиг. 17). В сравнение с несъхранявани култури коренообразуване почти отсъства. Спорадично развитие на корени е отчетено на средите с IBA. Поради бавното нарастване на *in vitro* културите от *R. aculeatus*, при съхранение могат да се използват стандартни условия, както при размножаване, което се оценява като икономически ефективен подход. Видът се съхранява безпроблемно в *in vitro* условия без специални изисквания и успешно се регенерира на среди без или с ниски концентрации на регулатори.

Фиг. 17. Растеж на издънките при регенерация на съхранявани 16 мес. култури от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE. Третиранията, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

4. Влияние на фактори на средата върху микроразмножаването на *R. hypoglossum*

4.1. Третиране с растежни регулатори

Получените калуси от *R. hypoglossum* показват различна регенерационна способност в зависимост от хранителната среда (табл. 1). Единствено при вариантите с TDZ в средата се наблюдава по-съществен растеж на калус и отсъствие на некроза. Най-голям брой регенеранти се получават на среда с 1 mg/l NAA и 0.5 mg/l тидиазурон – 5 издънки на експлант. Наблюдава се разрастване на издънките, деформиране и наделяне на връхната част на филокладиите и залагане на цветове с нетипично разположение. Деформациите във връхните части на филокладиите се запазват при субкултивиране.

Табл. 1. Влияние на растежни регулатори върху размножителния коефициент и морфогенетичните характеристики на *in vitro* култури от *R. hypoglossum*

Растежен регулатор/ Концентрация, mg/l				Среден брой издънки на експлант	Калусо- образу- ване	Вариации в морфоло- гията	Некроза
NAA	BAP	TDZ	KIN				
				0,25*	-	-	+++
			0,50	0,00	-	-	+++
			1,00	1,28	+	++	+
		0,20		0,95	+++	+++	-
		0,50		3,25	+++	+++	-
	0,50			0,89	-	+	++
0,50	1,00			0,33*	-	-	+++
1,00			0,50	0,00	-	-	+++
1,00		0,50		5,00	+++	+++	-

* директно получени регенеранти без дедиференциация; - липсва калусообразуване/вариации/некроза; + по-малко от ¼ от експлантите с калусообразуване/вариации/некроза; ++ до ½ от експлантите с калусо-образуване/вариации/ некроза; +++ повече от 2/3 от експлантите с калусообразуване/вариации/некроза.

Възможно е наблюдаваните вариации да са в рамките на нормална изменчивост на вида, проявяваща се спорадично в природата, но в процеса на *in vitro* култивиране е по-отчетливо, както е публикувано за други видове.

4.2. Влияние на концентрацията на захарозата

Калусните експлантите се развиват активно на среда с 15 до 60 g/l захароза, а при 90 g/l некрозиралите достигнат 50% (Табл. 2).

Табл. 2. Влияние на захарозата върху жизнените показатели и морфогенетичните характеристики на културите от *R. hypoglossum*

Показател	Захароза, g/l			
	15	30	60	90
Регенерационна способност, %	100b	100b	93b	50a
Размн. коефициент, бр. изд./експл.	3,07a	5,79b	8,38c	1,86a
Калусообразуване, %	36,67b	13,33a	6,67a	0,00a
Растежен индекс (GI)	2.07b	3.54c	2.74bc	0,88a
Криспатни издънки, %	40,00b	40,00b	0,00a	0,00a
Витрифицирани издънки, %	6,66b	0,00a	0,00a	0,00a
Некрозирали експлантите, %	0,00a	0,00a	6,67a	50,00b

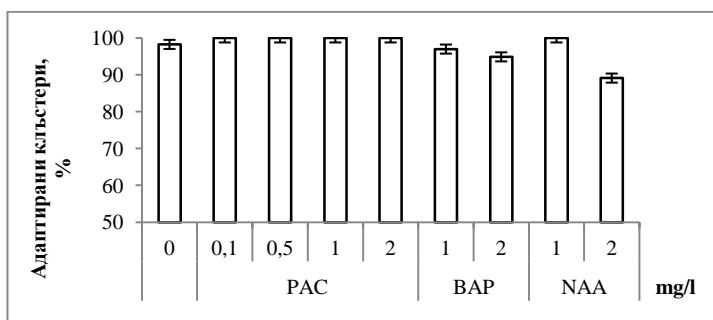
* Третираната, означени с еднакви латински букви, не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

Най-голям е прирастът на калуса на среда с 30 g/l захароза. Броят на регенерираните издънки достига максимум от 8.38 издънки на експлант при 60 g/l захароза. При 15 g/l захароза са регистрирани най-много отклонения, като витрифицирани и криспатни издънки. Оптималната концентрация на захарозата за получаване на издънки от калус е 60 g/l, при която процента на некротизиралите експланти е незначителен.

5. Адаптация *ex vitro* на *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*

Развитието на вкоренени издънки във фазата на намножаване на *R. aculeatus* (над 70%) позволи да отпадне етапа на вкореняване преди адаптация (фиг. 18). При всички варианти се отчита над 90% адаптация към нестерилни условия в неклиматизирана оранжерия.

Фиг. 18. Адаптация *ex vitro* на клъстери от регенерирани растения от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE.

Развитие на нов прираст беше наблюдавано още на първия месец след засаждане. Поради по-нежната си структура растенията от *R. hypoglossum* са по-чувствителни към аклиматизация *ex vitro*. Само половината от засадените растения оцеляха 1 месец след засаждане.

6. Характеризиране на получените култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*

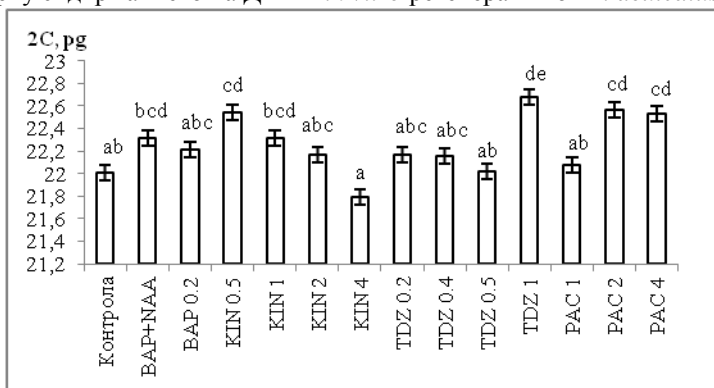
6.1. Количество на ДНК и стабилност на размера на генома

Всички резултати от цитометричния анализ на регенерантите от *R. aculeatus* показват, че третиранията с цитокинини и PAC, с изключение на тази при 4 mg/l KIN показват, водят до повишаване

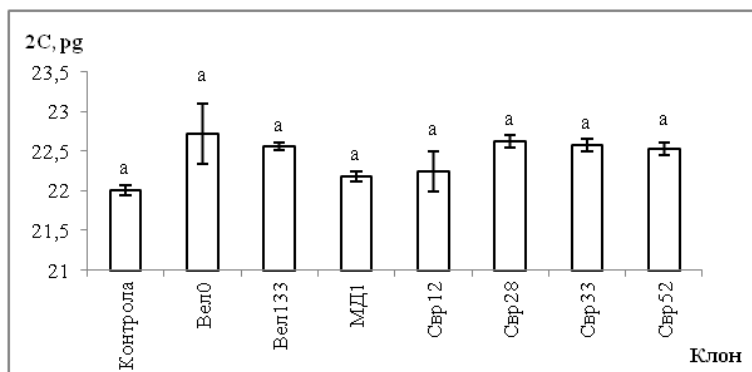
на количеството геномна ДНК в сравнение с контролата (2С=22.01-22.38 pg, фиг. 19). Отделните клонове, отглеждани на еднаква среда MS с 0.5 mg/l BAP, която не предизвиква значителни отклонения, показаха стабилни стойности без значими различия с контролата и помежду си (фиг. 20).

При *R. hypoglossum* получените индиректно през калус регенеранти от три клона също не показват значими различия по отношение съдържанието на ДНК спрямо контролата или помежду си (фиг. 21). Няма значими отклонения и при калуса и при растенията с криспатните издънки (2С=16,62-16.98).

Фиг. 19. Влияние на вида и концентрацията на растежните регулатори върху съдържанието на ДНК в *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*

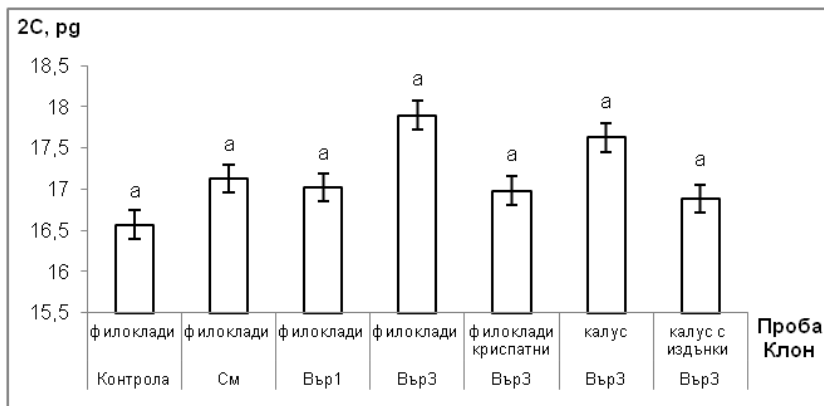


Фиг. 20. Влияние на произхода върху съдържанието на ДНК в *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE. Означените с еднакви латински букви не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

Фиг. 21. Влияние на произхода върху съдържанието на ДНК в *in vitro* регенеранти и калус от *R. hypoglossum*

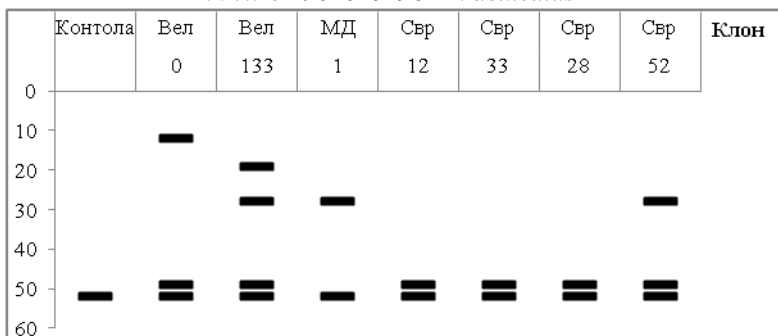


Стойностите са показани \pm SE. Означените с еднакви латински букви не се различават статистически ($P \leq 0.05$, DMRT)

6.2. Сравнително проучване на изоензимни профили на *in vitro* клонове от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*

Сравнените изоензимни профили на анодните пероксидази (POD) на *in vitro* клоновете от *R. aculeatus* показват, че всички клонове, освен характерния за *in vivo* контролата мономорфен локус (52), имат и допълнителни изоформи (фиг. 22). Наблюдаваните различия между отделните клонове свидетелстват за вариране при изопероксидазите в зависимост от произхода и изследваната култура.

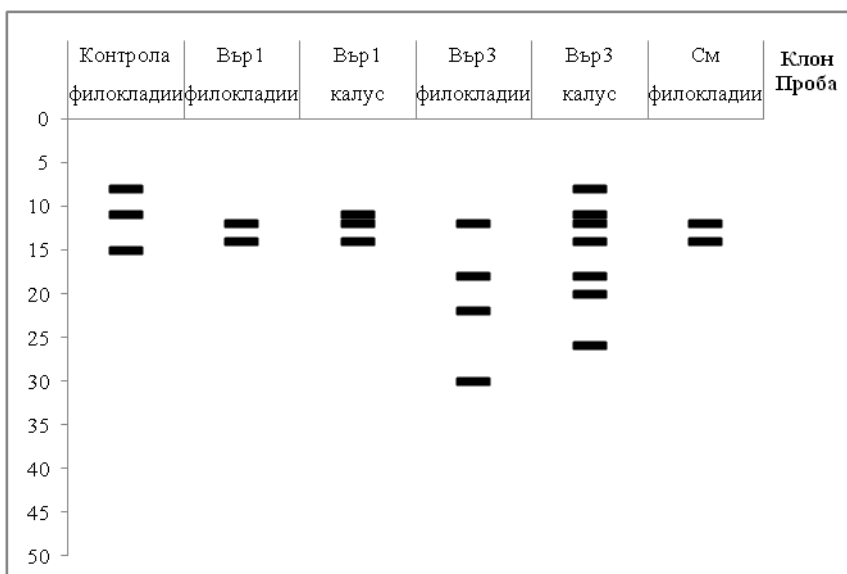
Фиг. 22. Схематично представяне на PAGE изопероксидазни профили на *in vitro* клоновете от *R. aculeatus*



При Свр33 са индуцирани най-много нови изоформи. Всички *in vitro* клонове са с поне три и повече изоформи, някои от които силно интензивни - бавните изоформи при клоновете с най-добра пролиферативна способност – Вел0, Свр12, Свр52.

Изоензимните профили на киселата фосфатаза при *R. hypoglossum* са показани на фиг. 27. Изоформи 8 и 11, отчетени в контролата, са регистрирани само в калусните култури, от които само при клон Вър3 се срещат и двете.

Фиг. 27. Схематично представяне на PAGE изоензимни профили на кисела фосфатаза на регенеранти и калус при *in vitro* клоновете от *R. hypoglossum*



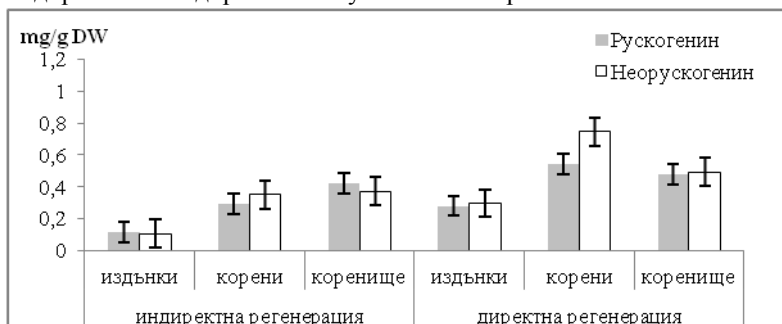
При калусните култури отчетените изоформи са силно интензивни и образуват ясно изразени зони.

При проведеното изследване за *R. aculeatus* като добри маркери за пролиферативната способност на клоновете се открояват пероксидазите и киселите фосфатази. При *R. hypoglossum* пероксидазите и естеразите са по-слабо полиморфни. Най-полиморфни и при двата вида *in vitro* бяха профилите на киселата фосфатаза, като при нея се наблюдават и най-много допълнителни изоформи. Наблюдаваните различия между отделните клонове не могат да се отнесат изцяло към условията на культивиране.

7. Фитохимичен скрининг на *in vitro* микроразмножени култури от *R. aculeatus*

Неорускогенин и рускогенин са установени във всички култури и растителни части (фиг. 28). Получените през калус растения са с по-слабо изявена биосинтеза на рускогенини и съдържанието на рускогенин и неорускогенин е до 2 пъти по-високо при директно регенерираните растения.

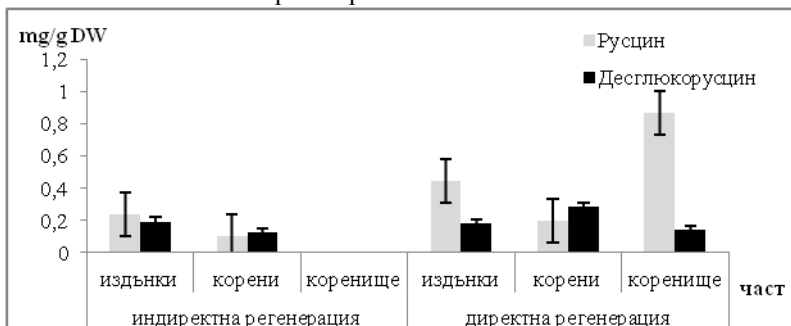
Фиг. 28. Разпределение на съдържанието на рускогенин и неорускогенин в директно и индиректно получени *in vitro* растения от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE.

Не се потвърди концепцията на Mangas et al. (2006), че биосинтезата на тези два сапогенина протича основно в надземните части и там тяхното съдържание е най-високо. При анализа са отчетени и не малки количества от монодезмозидите на неорускогенина (русцин и десглюкорусцин) (фиг. 29). Няма данни тези два сапонина да са анализирани в *in vitro* култури досега.

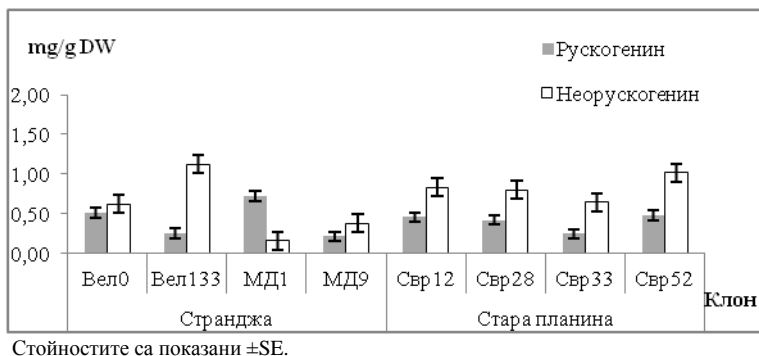
Фиг. 29. Разпределение на съдържанието на русцин и десглюкорусцин в *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE.

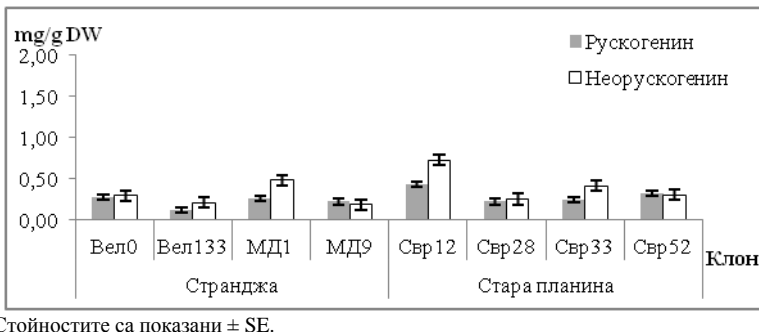
При всички изследвани клонове съдържанието на сапогенини е по-високо в подземните органи отколкото в издънките (фиг. 30). Неорускогенинът доминира в подземните части на почти всички клонове, като най-високо е съдържанието при Вел133 (1.12 mg/g DW). Изключение прави клонът МД1, при който рускогенинът е 0.72 mg/g DW към 0.16 mg/g DW неорускогенин.

Фиг. 30. Съдържание на рускогенин и неорускогенин в подземни части от *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*



В издънките количествата от двата сапогенина са доста близки, като неорускогенинът слабо доминира (фиг. 31).

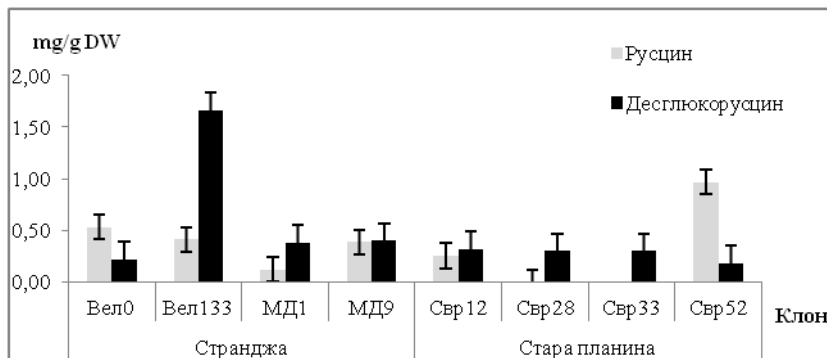
Фиг. 31. Съдържание на рускогенин и неорускогенин в издънки от *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*.



Най-високо съдържание на рускогенин (0.43 mg/g DW) и на неорускогенин (0.7 mg/g DW) е регистрирано при клон Свр12. Съдържанието на русцин и десглюкорусцин е значително и при подземните части и при издънките (фиг. 32 и 33). Най-високото

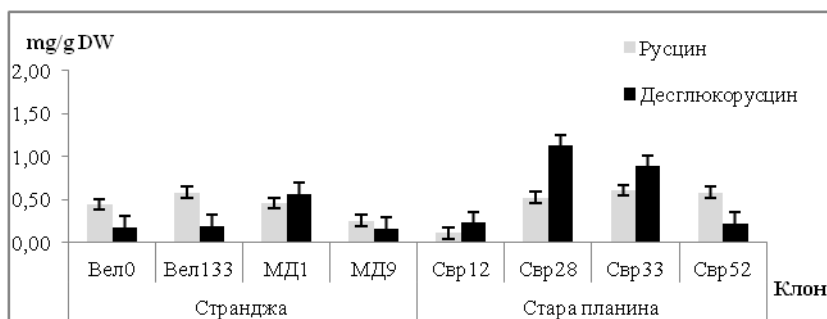
съдържание на десглюкорусцин (1.66 mg/g DW) е установено в подземните части на клон Вел133 (Странджа). Русцин в най-голямо количество е определен при клон Свр52, докато при клоновете Свр28 и Свр33 – липсва.

Фиг. 32. Съдържание на русцин и десглюкорусцин в подземни части от *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE.

Фиг. 33. Съдържание на русцин и десглюкорусцин в издънки от *in vitro* регенеранти от *R. aculeatus*



Стойностите са показани \pm SE.

Получените данни показват тенденция, стероидните сапогенини и сапонини да се акумулират основно в подземните органи, като доминиращ е неорускогенинът. Може да се предположи, че произходът на използвания донорен материал има значение за продуктивността на стероидни сапонини в *R. aculeatus in vitro*.

Изводи

1. Инициирането на *in vitro* култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum* с произход от български популации е продължителен процес, обусловен от биологичните особености на двата вида – дълбок морфо-физиологичен покой на семената и бавно развитие на растенията.
2. Изборът на донорен материал (семена или вегетативни части) е от особена важност за успеха на инициация на *in vitro* култури от двата вида:
 - вегетативните експланти (коренища и надземни части) от донорни растения от естествените находища са неподходящи поради високата степен на заразяване (коренищата) и липса на развитие (надземни части);
 - Семената и изолирани зародиши от тях могат да се използват успешно, но се характеризират с ниска кълняемост (до 15% при *R. aculeatus* и до 35% при *R. hypoglossum*) и период на покълване до 2 години.
3. Инициалните семенни клонове и от двата вида имат продължителна lag-фаза (от 6 до 12 мес. при *R. aculeatus* и 10 мес. при *R. hypoglossum*) и различен размножителен потенциал.
4. При *R. aculeatus* успешно размножаване на 12 инициални клона от 4 произхода е постигнато чрез директна регенерация на издънки от *in vitro* коренищни експлантни на среда с BAP (1 mg/l) и NAA(0.5 mg/l).
5. При *R. hypoglossum* издънки от 3 клона от 2 произхода бяха получени индиректно през калус на среда с 0.5 mg/l TDZ, като инициираните култури често са с отклонения в морфологията на издънките.
6. При оценката на факторите, влияещи върху микроразмножаването на *in vitro* култури от *R. aculeatus*, са направени следните изводи:
 - Претретиране с течна среда за не повече от месец осигурява размножителен коефициент до 30 издънки на експлант, като

при последващо субкултивиране на среди с NAA и BAP достига 70.

- Размножителният коефициент се увеличава четирикратно при 3-годишно култивиране на агарови среди с BAP.
 - На агарови среди PAC (1 mg/l) осигурява най-висок размножителен коефициент – 5.88 издънки/експлант, а TDZ и KIN показват слаб стимулативен, независимо от концентрацията си в средата.
 - Повишаването на концентрацията на захароза от 30 до 60 g/l не повлиява положително растежа и размножаването на културите, при 90 g/l се снижават всички показатели, най-ефективна и икономически изгодна е 15 g/l на хранителни среди без регулатори.
 - Двухазното култивиране е ефективно при *in vitro* съхранение на културите при 24°C, осигурявайки 18 месечно съхранение без прехвърляне на свежа среда при запазване на жизнените показатели на културата. Най-добри условия за рекултивация осигуряват среди без растежни регулатори или с ниски концентрации на TDZ и кинетин.
 - Ефективни за коренообразуването са вариантите на среди, съдържащи само или повече BAP, а високите концентрации на NAA стимулират нарастването на коренището. Вкореняването протича паралелно с развитието на издънките и не се налага допълнително третиране за индукция на корени.
7. При микроразмножаване на *R. hypoglossum* положителни резултати бяха получени единствено на среди с TDZ, като най-висок размножителен коефициент (5 издънки на експлант) е получен при агарова среда с TDZ и NAA. Последващо култивиране без регулатори с 60 g/l захароза повишава размножителния коефициент до 8 издънки на експлант.
8. Директното развитието на вкоренени издънки във фазата на намножаване позволява да отпадне етапа на вкореняване преди адаптация. При *R. aculeatus* адаптацията при нестерилни условия достига 90%, при добавяне на PAC в средата за размножаване – 100%, а при *R. hypoglossum* - 50%.

9. Цитометричното характеризиране на културите показва, че при *R. aculeatus* значимите разлики в съдържанието на ДНК не са свързани с конкретни морфо-физиологични вариации. При *R. hypoglossum* при значителни морфологични изменения е регистрирано минимално вариране в количеството на ДНК.
10. Анализът на пероксидазните, естеразните и фосфатазните изоензимни профили на *in vitro* културите от двата вида се наблюдава клоновоспецифична поява и загуба на изоформи.
11. Съдържанието на рускогенини (рускогенин, неорускогенин, русцин и десглюкорусцин) в *in vitro* култури от *R. aculeatus* е най-високо в корените и коренищата на директно регенерирани растения – в корените доминира неорускогенин, а в коренищата – русцин. При всички анализирани клонове съдържанието и съотношението на изследваните рускогенини е специфично – с добри показатели се отличава клон Вел133 с най-голямо съдържание на неорускогенин (1.12 mg/g DW) и десглюкорусцин (1.66 mg/g DW) в подземните части.

Приноси

1. Инициирани са *in vitro* култури и са разработени протоколи за микроразмножаване на клонове от *R. aculeatus* (12 клона от 4 произхода) и *R. hypoglossum* (3 клона от 2 произхода) с донорен материал от естествените популации на двата вида в България.
2. Получени са калусни култури от *R. hypoglossum* от коренищни експлантати на *in vitro* семеначета и от тях са регенерирани цели растения.
3. Цитометрично са характеризирани *in vitro* култури от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*, като разликите в съдържанието на ДНК не винаги са свързани с конкретни морфологични или физиологични вариации.
4. За пръв път са сравнени изоензимни профили на *in vitro* клонове от *R. aculeatus* и *R. hypoglossum*, като се демонстрира клоновоспецифично вариране в култура.
5. За пръв път се определя съдържание на русцин и десглюкорусцин в *in vitro* култури.
6. Разпределението на рускогенини в отделните растителни части на *in vitro* култури от *R. aculeatus* от български произходи е сходно с това в нативни растения и опровергава обобщения на ниво вид, на база други произходи.
7. Разработена е схема за повишаване на ефективността на микроразмножаване при *R. aculeatus* чрез комбиниране на претретиране с течна среда за не повече от месец и последващо субкултивиране на среди с NAA и BAP, осигуряваща размножителен коефициент 70 издънки на инициален експлант.
8. Разработен е ефективен метод за съхранение на *in vitro* клонове от *R. aculeatus* в двуфазна среда, при 24°C, който позволява 16 месечно съхранение без прехвърляне на свежа среда, при запазване на висока регенерационната способност и добър размножителен коефициент на културите при рекултивация на среди без или с ниски концентрации на TDZ и KIN.

Списък на участията в научни форуми

1. 5-та Международна конференция „Propagation of Ornamental Plants” (5-8. 09. 2007, София). Ivanova T., Gussev Ch., Bosseva Y., Stanilova M., Stoeva T. *In vitro* regeneration of *Ruscus aculeatus* L. – effective micropropagation by shoot cultures.
2. 5th Balkan Botanical Congress, Belgrade, Serbia, 07-11. (7-11. 09. 2009, Белград). Ivanova, T., Gussev, Ch., Bosseva, Y., Stoeva, T., 2009, Storability of micropropagated *Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) plants.
Цитат: Brezeanu, A., Vanciu, C. 2010. *In vivo* and *in vitro* comparative ultrastructural studies of *Ruscus aculeatus* L. phylloclade cells. Rom. J. Biol. – Plant Biol., 55(1): 27–36
3. VII Национална конференция по ботаника (29-30 09 2011, София). Иванова Т., Димитрова Д., Гусев Ч., Босева Ю., Стоева Т. Стабилност на размера на генома при *in vitro* регенеранти на *Ruscus aculeatus* L. и *R. hypoglossum* L. (*Ruscaceae*), резюме ISBN 987-954-92808-1-4

Списък на публикациите по темата на дисертацията

1. **Ivanova T.**, Gussev Ch., Bosseva Y., Stanilova M., Stoeva T. 2008. *In vitro* regeneration of *Ruscus aculeatus* L. – effective micropropagation by shoot cultures. Propagation of Ornamental Plants 8 (1):39-41.
2. **Ivanova T.**, Gussev Ch., Bosseva Y., Stoeva T. 2011. *In vitro* conservation of micropropagated *Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) plants. Botanica Serbica. 35(1):61-66.

***In vitro* cultivation of *Ruscus aculeatus* L. and *Ruscus hypoglossum* L. (*Liliaceae*)**

Teodora A. Ivanova

PhD thesis, Sofia, 2012

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research,
Bulgarian Academy of Sciences;
23 Acad. G. Bonchev Str., Sofia 1000, Bulgaria; e-mail: tai@bio.bas.bg;

Supervisor: Assoc. Prof. Tatyana Stoeva, PhD

Summary

Ruscus aculeatus L. and *R. hypoglossum* (*Liliaceae*) are small evergreen shrubs used both in gardening and as cut foliage. The rhizomes of *R. aculeatus* are widely collected as a drug source of steroid saponins with antiinflammatory, venotonic and antihemorrhoidal activity. Both species are considered conservationally important in several countries due to the fact that cut foliage and rhizomes have been collected predominantly from the wild. In Bulgaria a regulated regime of gathering was prescribed for *R. aculeatus* and *R. hypoglossum*. The natural slow reproduction cycle and specific culture requirements hinder wide field cultivation. Recently, *in vitro* cultivation of both species has been performed for the production of planting material and conservation purposes mainly with material of Spanish, Portuguese and Romanian origin. However many technological aspects remained unsolved and the micropropagation protocols contained unequivocal and unclear parameters.

The aim of this thesis was to initiate *in vitro* cultures of *R. aculeatus* and *R. hypoglossum* from donor material of Bulgarian wild origin and to assess the influence of different culture factors on *in vitro* propagation and conservation: explant type, plant growth regulators and their concentration, culture type and sugar content. The characterization of the clonal variability and effect of culture conditions on plant genetic integrity was conducted by means of flow cytometry (DNA content and genome stability) and PAGE isozyme analyses of peroxidase (POD), esterase (EST), and acid phosphatase (ACP). Determination of

biosynthetic potential and localization of saponins in *R. aculeatus* cultures was carried out using phytochemical HPLC analysis of ruscogenins (ruscogenin, neoruscogenin, ruscin and desglucoruscin).

Twelve clones of *R. aculeatus* from 4 origins and 3 clones of *R. hypoglossum* from 2 origins were initiated and protocols for micropropagation were developed. Culture initiation from seeds was limited by the deep morpho-physiological dormancy, low germination rates (*R. aculeatus* 15% and *R. hypoglossum* 35%), and prolonged 6-12 months lag-phase. Vegetative explants were unsuitable due to the high contamination or lack of development. Shoots were obtained through direct regeneration on *in vitro* rhizome explants of *R. aculeatus* on MS media supplemented with BAP (1 mg/l) and NAA (0.5 mg/l). *Ruscus hypoglossum* cultures regenerated shoots through callus, initiated on media with 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ). This caused somaclonal variation of shoots and cladodes – crispate shoots, monstrous cladodes and random inflorescence development.

Up to 70 shoots per initial *R. aculeatus* explant were obtained in the propagation stage using combination of pre-cultivation in liquid culture and subcultivation on agar media with NAA and BAP. Propagation rate increased 4 times for 3 years on media with BAP. Paclobutrazol was most efficient in agar cultures resulting in 5.88 shoots per explant. Sucrose concentration of 15 g/l was found to be most suitable for propagation on agar media without growth regulators.

Although it was not useful for propagation, two-phase cultivation of *R. aculeatus* proved to be effective for *in vitro* conservation at ambient conditions, ensuring 16-month effortless storage and fast recultivation on agar media without regulators or low concentrations of TDZ and KIN.

Micropropagation of *R. hypoglossum* was successful only on media with TDZ reaching highest multiplication rate of 5 shoot per explant on agar media with TDZ (0.5 mg/l) and NAA (1 mg/l). Consecutive cultivation on media without growth regulators and 60 g/l sucrose provided 8 shoots per explant.

Development of rooted shoots in the propagation stage allowed direct planting of clusters *ex vitro*. Survival of *R. aculeatus* plantlets was about 90% and reached 100% in regenerants, raised on paclobutrazol containing media. *Ruscus hypoglossum* plantlets, with their brittle and delicate cladodes, were more sensitive to *ex vitro* conditions and about 50% survived after one month of adaptation.

Cytometric assessment of both species proved that statistically significant changes in DNA content of the regenerants were not always related to the observed morphological variations and vice versa. No significant changes in DNA content and genome instabilities were detected in the obtained clones. Isozyme analyses showed clonally related induction and loss of isoforms that could be assigned to culture conditions, stage of differentiation or intraspecific variation.

Phytochemical screening of the *R. aculeatus in vitro* cultures demonstrated that all cultures produced saponins and the content was higher in the underground parts of the directly regenerated plants. Neoruscogenin dominated in the roots and ruscin in the rhizomes. Comparison of the clones showed differential synthetic potential. Clone Vel133 originated from Strandzha mountain showed highest contents of neoruscogenin (1.12 mg/g DW) and desglucoruscin (1.66 mg/g DW) in the underground parts.