



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

КРАСИМИРА НЕДЯЛКОВА ТАШЕВА

***IN VITRO* КУЛТУРИ ПРИ *RHODIOLA ROSEA* L. - ПРОУЧВАНЕ
ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ
НА ВИДА И ЗА ПРОДУЦИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНО
АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На Дисертация за присъждане на
образователна и научна степен “доктор”
Научна специалност: **01.06.06 Генетика**



София, 2011

Работата е обсъждана и насрочена за защита на заседание на разширения Научен съвет на секция „Биотехнология на растенията” при Институт по физиология на растенията и генетика, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2011г. в часа в заседателната зала на ИФРГ, БАН, София 1113, ул. Акад. Г. Бончев”, бл. 21 на открито заседание.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Институт по физиология на растенията и генетика, БАН.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

КРАСИМИРА НЕДЯЛКОВА ТАШЕВА

***IN VITRO* КУЛТУРИ ПРИ *RHODIOLA ROSEA* L. - ПРОУЧВАНЕ
ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ВИДА
И ЗА ПРОДУЦИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА**

АВТОРЕФЕРАТ

На Дисертация за присъждане на
образователна и научна степен “доктор”

Научна специалност: **01.06.06 Генетика**

Научен консултант:
Доц. д-р Георгина КОСТУРКОВА

Рецензенти:

Проф. д.б.н. Йорданка ИВАНОВА
Доц. д-р Венета КАПЧИНА – ТОТЕВА

София, 2011

Дисертационния труд е написан на 204 страници. Резултатите са представени в 39 таблици, 22 фигури и 20 фотографии. Библиографската справка съдържа 326 заглавия, от които 34 на кирилица и 292 на латиница.

Изследванията по дисертацията са проведени в секция "Биотехнология на растенията" към бившия Институт по генетика, в секция „Приложна ботаника“ на бившия Институт по ботаника, в лабораторията „Химия на природните вещества“ на Института по органична химия с център по фитохимия, БАН, в група „Изкуствен интелект“ към катедра Информационни технологии, на Математически факултет при Софийския университет.

Автор:

Красимира Недялкова Ташева

Заглавие:

***In vitro* култури при *Rhodiola rosea* L. - проучване възможностите за размножаване и съхранение на вида и за продуциране на биологично активни вещества.**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

БА (БАП) – бензиладенин, бензиламино-пурин

БАВ – биологично активни вещества

2,4 – Д – 2,4 – дихлор-фенокси-оцетна киселина

2-iP - N⁶- (Δ^2 -Isopentenyl)-Adenine,

GA₃ – гибберелинова киселина (ГК)

АНО (НОК) – α -нафтил-оцетна киселина

ИОК – β -индолил-3- оцетна киселина

ИМК – β - индолил-маслена киселина

MS среда – среда по Мурасиге и Скуг (Murashige and Skoog (MS)), 1962

Б5 среда – Среда по Гамборг, (Gamborg's B5),

ТДЗ, Тидиазурон – N- фенил-N' -(1,2,3, тидиазол-5) уреа

Зеатин – 6-(4-хидрокси-3-метил-2 бутенил-амино) пурин

GA (GAE) – галова киселина (еквивалент галова киселина)

DPPH - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

България е позната с богатството си от лечебни растения. Страната ни е една от водещите в световен мащаб по износ на диворастящи лечебни растения, като над 50 % от тях се събират в природата. Българските лечебни растения се смятат за едни от най-качествените поради специфичните почвени и климатични условия в страната и са известни с високото си съдържание на лечебни вещества. Интензивното използване на растителните ресурси от лечебни растения доведе до реална опасност от изчезване на популациите и/или рязко намаляване на числеността им в тях, свързани и с намаляване на генетичното разнообразие. В последните години у нас се провеждат интензивни биологични, екологични и фитохимични изследвания, които спомагат за опазване и разумно използване на някои от застрашените и редки видове. На базата на тях се разработи национална стратегия за опазване на биологичното разнообразие от лечебни растения. *Rhodiola rosea* (златен корен, златовръх) е застрашен от изчезване вид и е защитен от Закона за биологичното разнообразие. Стопанското му значение е свързано с приложението му в медицината. Екстрактите, получени от корените и коренището на родиола се използват като стимулиращо средство при понижена работоспособност, в психиатричната практика, при функционални заболявания на нервната система, като имуностимулатор и адаптоген, в профилактиката при социално значими болести – ракови и сърдечно съдови.

Методите за отглеждане на тъканни култури *in vitro* са едно от бързо развиващите се направления, имащи не само теоретични, но и приложни аспекти със значителен икономически ефект. Микроразмножаването или клонирането *in vitro* позволява бързо производство на генетично идентични копия. С помощта на *in vitro* методите могат да се подобрят и продуктите от вторичния метаболизъм, които имат голямо значение при растенията продуценти на биологично активни вещества. Биотехнологичните методи предоставят възможност за бързо клониране и поддържане на генетичната структура на растенията както и за промяна на генетичната информация и експресия за получаване на ценни вещества с нови качества и/или в по-големи количества.

От направената справка на литературата се вижда, че въпреки големия интерес към *Rh. rosea* и интензивните изследвания в областта на фитохимията, една потенциална сфера – тази на биотехнологиите, остава все още не добре изучена. Наличната информация показва многофакторна зависимост отговорна за създаване на *in vitro* култури и манипулирането с техните биосинтетични пътища. Получените резултати на авторите, работещи в областта на биотехнологиите, не само с *Rh. rosea*, но и с други видове от този род показват, че отглеждането на *Rhodiola rosea* L. в култура *in vitro* е труден процес, зависещ от редица фактори.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на докторската дисертация е получаването на *in vitro* култури и микроразмножаване при български екотип *Rhodiola rosea* L. и проучване на възможността за приложението им за съхранение и размножаване на вида, както и за синтез на биологично активни вещества чрез разработените биотехнологични методи.

За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Получаване на *in vitro* култури. Разработване на схеми за индуциране на органогенезис, калусогенезис и регенерация на растения в *in vitro* условия.

1.1. Подбор на изходния материал от диви растения и семена.

1.2. Създаване на процедури за обеззаразяване на изходния материал и семената в степен позволяваща работа *in vitro*.

1.3. Изолиране на различен тип експланти от диви растения, растящи в естествени условия (*in vivo*) и от растения регенеранти получени *in vitro*.

1.4. Оценка на значението на типа на екплантите за получаване на успешни *in vitro* култури.

1.5. Съставяне на рецепти на хранителни среди с различен състав по отношение на фиторегулаторите, органичните и неорганичните съставки и определяне на оптималните от тях за развитие на семената и тъканите *in vitro*.

1.6. Подбор на оптимални условия за култивиране *in vitro* (температура, интензитет на светлината, фотопериод).

1.7. Получаване на калусни и органогенни култури с продължителна способност за развитие *in vitro* (long-term cultures).

2. Разработване на системи за микроразмножаване *in vitro*.

2.1. Оптимизиране ефективността за формиране на нови пъпки и регенерация на растенията.

2.2. Индуциране на ризогенезис в адвентивните пъпки и регенерантите

3. Адаптация на растенията регенеранти за развитие в условия *in vivo*.

3.1. Подбор на субстрат за вкореняване на получените растения-регенеранти.

3.2. Подбор на физическите параметри за развитие *in vivo* на растенията получени *in vitro* (температура, влажност на въздуха, интензитет на светлината, фотопериод).

4. Цитологична и морфологична характеристика на *in vitro* културите и растенията регенеранти.

5. Фитохимични изследвания на антиоксидантната активност и съдържанието на биологично активни вещества в калусни култури, корени и коренища на диворастящи и *in vitro* получени растения.

5.1. Изследване съдържанието на салидрозид в диворастящи видове и в растения получени *in vitro* чрез спектрофотометрия.

5.2. Изследване съдържанието на салидрозид, розарин, розавин и розин в диворастящи видове, в растения получени *in vitro* и в калусни култури чрез високо-ефективна течна хроматография (BETX, HPLC).

5.3. Определяне на съдържанието на флаваноидите и общите феноли в диворастящи растения, в растения получени *in vitro* и в калусни култури.

5.4. Определяне на антирадикалова активност в диворастящи растения, в растения получени *in vitro* и в калусни култури.

6. Приложение на *in silico* (компютърни) методи при прогнозиране индуцирането на калус, и съдържанието на общи феноли, флавоноиди и антирадикалова активност (IC₅₀) при *Rhodiola rosea* L.

6.1. Тестов дизайн на различни варианти на таблиците с входно-изходна информация

6.2. Прогнозиране индуцирането на калуси и неговите характеристики въз основа на различни хранителни среди.

6.3. Прогнозиране на съдържанието на общи феноли, флавоноиди и антирадикаловата активност (IC₅₀) в калусна култура.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изходен растителен материал.

В изследванията като изходен растителен материал бяха включени семена и диворастящи растения (от Рила и Родопите).

В експериментите за получаване на *in vitro* култури бяха използвани 8 вида експланти от диви растения (връхни пъпки, адвентивни пъпки, стъблени сегменти, пъпки от коренище, и експланти от коренище без пъпка) и от кълнове, получени от *in vitro* покълнали семена (връхна пъпка, стъблен сегмент с два листа и прилистни пъпки и коренов експлант изолиран от основата на корена).

2. Въвеждане на експланти в култура *in vitro*.

За получаване на калусни култури бяха използвани различни експланти изолирани от: *in vivo* растения (диви растения) - връхни пъпки, стъбло, и пъпки от коренище; листчета/листа от *in vitro* размножени растения. За индуциране на органогенезис бяха използвани три вида експланти: пъпки на коренище на диви растения; връхни пъпки и стъблени сегменти от покълнали зрели семена в условия *in vitro*.

3. Условия за култивиране на материала *in vitro* и *in vivo*.

При индуциране на органогенезис и регенерация експлантите и растенията бяха култивирани при светлина с интензитет $40 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$, температура $21 - 22^{\circ}\text{C}$, 16-часов фотопериод. Калусните култури бяха индуцирани и подържани при по-слаба разсеяна светлина с интензитет $20 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ и температура $18 - 21^{\circ}\text{C}$.

Растенията регенеранти образували корени бяха прехвърлени в саксийки за адаптиране. Адаптацията на растенията се провеждаше във фитостатно помещение. Изпитани бяха различни субстрати - почва, торф, перлит, самостоятелно или в различни съотношения, и различни условия за адаптиране - влажност от 60% до 95 %, температура – 18° , 22° , 24°C и светлина $40 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ и $60 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Аклиматизираните растения бяха прехвърляни в оранжерия и подготвяни за последващата адаптация в природата.

Растения регенеранти бяха засаждани на експерименталното поле на Института по ботаника в местността Беглика в Родопите (1525 м.н.в., средна годишна температура 3.8°C и средна норма на валежите 1.002 мм/м^2), като насажденията бяха прекопавани два пъти годишно.

4. Обеззаразяване на изходния материал.

В нашите изследвания бяха използвани редица дезинфектанти – етилов алкохол от 70% до 96 %, два вида търговска белина, съдържаща различен процент активен хлор – 2.2% и 5.0 %, водороден пероксид (H_2O_2) (3%) и живачен двухлорид (HgCl_2) (0.2%), прилагани в различни концентрации и комбинации. Всяка процедура беше последвана от трикратно промиване с двойно дестилирана вода (дд H_2O) съответно за 5, 10 и 15 минути.

Преди въвеждане в култура *in vitro*, зрелите семена бяха обеззаразявани по следните схеми:

- (1) 96 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 5 минути;
- (2) 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 3 мин; 20 % [об/об] белина (съдържаща 5 % активен хлор) за 15мин
- (3) 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 1 мин; белина за 5 мин;
- (4) 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 1 мин; белина за 10 мин;
- (5) 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 1 мин; 0.2 % HgCl_2 за 10 мин;
- (6) 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 3 мин; 20 % белина (2.2 % активен хипохлорид) за 20 мин.

При култивирането на експлантите от коренище от диви растения всички покривни люспи бяха отстранявани преди обеззаразяването (таблица 1).

Таблица 1. Схеми на обеззаразяване на експланти изолирани от диви растения *Rh. rosea*.

	Схеми за обеззаразяване	Експланти подложени на обеззаразяване				
		Връхна пъпка	Адвентивни пъпки	Стъбло	Пъпки от коренище	Коренище
1.	70% C ₂ H ₅ OH - 1'	+	+	+	+	+
2.	70% C ₂ H ₅ OH – 3' 20% белина – 15'	-	-	-	+	+
3.	70% C ₂ H ₅ OH – 1' 15% белина – 20' 0.2% HgCl ₂ – 15'	+	-	-	+	+
4.	70% C ₂ H ₅ OH – 1' 3 % H ₂ O ₂ – 5' 0.2 % HgCl ₂ - 10'	-	+	+	+	+
5.	70% C ₂ H ₅ OH – 5' 20% белина – 15' 0.2 % HgCl ₂ – 15'	-	-	+	-	+
6.	70% C ₂ H ₅ OH – 1' Белина – 17'	-	-	+	+	+

(+) - приложена схема на обеззаразяване; (-) - не приложена

5. Състав на хранителните среди използвани за *in vitro* култури при *Rh. rosea*

В експериментите за покълване на семената бяха използвани осем варианта хранителни среди на базата на Мурасиге и Скуг (MS), (Murashige and Skoog, 1962) (таблица 2). За индуциране на калусогенезис, органогенезис и регенерация бяха използвани твърди хранителни среди на базата Мурасиге и Скуг (MS) и разработени техни варианти (таблица 3, 4, 5 и 6).

Таблица 2. Състав на вариантите хранителни среди за покълване на семена от *Rhodiola rosea* L. за 1 литър, по Мурасиге и Скуг, (1962), pH 5.7 – 5.8.

Вариант хранителна сред	GA ₃ [mg/l]	Захароза [g/l]	Arap [mg/l]
MS0	0	20	6
MSG1	5	20	6
MSG2	10	20	6
MSG3	25	20	6
MSG4	50	30	6
MSG5	50	30	4
MSG6	100	30	6
MSG7	100	30	4
MSG8	150	30	6

Таблица 3. Състав на вариантите хранителни среди за индуциране на калусогенезис от експланти от диви растения *Rh. rosea* L. (за 1 литър), pH 5.7 – 5.8

Вариант хран. среда	ТДЗ [mg/l]	БАП [mg/l]	Кинет [mg/l]	ИОК [mg/l]	2,4-Д [mg/l]	Глутамин [mg/l]	Казеин хид. [mg/l]
MSBD		2.0			2.0		
MSBI2		0.2		0.1			
MSD	3.0			0.3	1.0		
MSD1	3.0			0.3	1.0		1000
MSD4	4.0			0.4			
MSDI1	0.1			0.05			
MSDI2	0.2			0.1			
MSDI3	0.4			0.2			
MSB1		1.0		0.1			
MSDK			1.0		4.0	100	
MSDK1			1.0		4.0	100	1000

Таблица 4. Състав на хранителните среди за индуциране и поддържане на калусни култури получени от листчета от *in vitro* размножени растения *Rh. rosea* L. (за 1 л), pH 5.7

Вариант Хран. среда	БАП [mg/l]	2-іР [mg/l]	Кинетин [mg/l]	2,4-Д [mg/l]	ИОК [mg/l]	АНО [mg/l]	Каз.хид. [mg/l]	Глутамин [mg/l]
MS контрола	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.0			2.0				
3	1.0			1.0				
4	1.0			0.5				
5	0.5			1.0				
6	1.0			1.0			1000	
7	1.0			0.5			1000	
8	1.0					1.0		
9	0.5					1.0		
10	1.0					1.0	1000	
11	1.0					0.5	1000	
12	0.5				1.0			
13		3.0			0.3			150
14		3.0				1.0		150
15		0.3			0.3			150
16			1.0	0.1	0.2			
17				0.1	0.2			
18				0.1	0.2		1000	

Таблица 5. Състав на хранителните среди използвани за *in vitro* регенерация и микроразмножаване при *Rhodiola rosea* L. (за 1 литър), pH 5.7 – 5.8

Вариант хран.ср.	Зеатин [mg/l]	БАП [mg/l]	Кинетин [mg/l]	2-іР [mg/l]	ИОК [mg/l]	АНО [mg/l]	GA ₃ [mg/l]	Глутамин [mg/l]	Казеин.хидр. [mg/l]
MSZ	2.0				0.2				
MSZ1	2.0				0.2				1000
MSZ2	0.2				0.2				
MSZ3	2.0				0.2			150	1000
MSZ4	1.0				0.2		0.4		1000
MSZ5	2.0				0.2		0.4		
MSB		2.0			0.2				
MSB1		1.0			0.1				
MSB2		0.5			0.1				
MSA			0.1			0.1			
MSA1			0.1			1.0			
MSI				3.0	0.3			150	
MSI1				3.0		0.6		150	
MSI2				3.0		0.3		150	
MSP				4.0	0.8				1000

Таблица 6. Състав на хранителните среди за индуциране на корени при *in vitro* размножени растения *Rh. rosea* L. (за 1 литър, 1/2 MS), pH 5.7 – 5.8

Вариант хранителна среда	ИМК [mg/l]	ИОК [mg/l]	АНО [mg/l]	GA ₃ [mg/l]	Захароза [g/l]	Arap [g/l]
MSR0-K					10.0	4.0
MSR1	1.0			1.0	20.0	4.0
MSR2			1.0	1.0	20.0	4.0
MSR3	2.0			1.0	10.0	5.0
MSR4	2.0	0.2		1.0	10.0	5.0
MSR5	0.5			1.0	10.0	4.0
MSR6	0.25			1.0	10.0	4.0
MSR7	0.1			1.0	10.0	4.0
MSR8	2.0	0.2		0.4	10.0	4.0

Стерилизацията на хранителните среди се осъществяваше чрез автоклавиране при налягане 1.1 kg/cm^{-2} , 121°C , за период от 20 минути. Материалите използвани при провеждане на експериментите бяха автоклавиран при налягане 1.1 kg cm^{-2} , 121°C за период от 30 минути.

6. Морфо-физиологична и цитологична характеристика на *in vitro* културите и растенията регенеранти

За провеждане на морфо-физиологична характеристика бяха проследявани расте, цвят и структура на калуса, процент органогенезис, брой пъпки и растения регенеранти и тяхното развитие. Тези критерии бяха използвани за сравнение на културите, получени на различни хранителни среди, както и на регенерантите с дивите растения. За основните признаци бяха оценявани качествени и количествени характеристики.

Емпирично бяха установени условията за приготвяне на качествени „squash” препарати за определяне броя на хромозомите от коренова меристема на регенеранти на *Rhodiola rosea*, получени чрез тъканни култури на различни хранителни среди (MSR0, MSR-1, MSR-4, MSR-8).

7. Фитохимични изследвания на *in vitro* получени и диви растения и калусни култури от *Rhodiola rosea*

За количествено определяне на основните комплекси от биологично активните вещества в *Rh. rosea* бяха извършени фитохимични изследвания на получените *in vitro* култури от калуси и в растенията регенеранти с използването на спектрофотометричен (фармакопееен) метод и високоефективна течна хроматография (BETX, HPLC).

Съдържанието на общите феноли беше определено използвайки Folin–Ciocalteu метода.

Съдържанието на флавоноидите беше определено по метод, разработен от Zhishen et al. (1999).

Антирадикаловата активност беше измерена спектрофотометрично по метода на Molynеux (2004).

8. Биоинформатични методи

Беше проведен биоинформатичен анализ за прогнозиране на съдържанието на общите феноли, флавоноиди и антирадикалова активност (IC_{50}) в калуси, продукт на „*in silico*” методи, чрез анализ на 110 предполагаеми хранителни среди. В проведеното изследване беше избран методът Невронни мрежи. Анализът се провеждаше на няколко етапа:

1. Подготвителен етап.
2. Същински експеримент - 2 подетапа:

Подетап 1. Прогнозиране на характеристиките на калусите въз основа на различните хранителни среди – тук се прогнозира структура, консистенция и цвят на калуса, процент индуциран калус (на 30-я и 45-я ден), свежо и сухо тегло на калуса.

Подетап 2. Прогнозиране на съдържанието на общи феноли, флавоноиди и антирадикаловата активност (IC_{50}), на базата на хранителните среди и характеристиката (структурата/ консистенцията и цвят) на калусната тъкан. В този етап за входни параметри се използват резултатите от подетап 1.

3. 3D PCA анализ (Principal Component Analysis) на данните от прогнозирането с помощта на програмата R*.

Входни данни за биоинформатичния анализ. Използват се вариантите на оригиналните хранителни среди за индуциране на калусогенезис от биологичния опит (таблица 4). Въведена бе бинарна кодировка за характеристиките (структура, консистенция и цвят) на калусната тъкан получени на оригиналните варианти хранителни среди: Код 0 съответства на „липсва”, код 1 – „проявен”.

9. Статистическа обработка на данните

Статистическите анализи бяха изготвени с помощта на Sigma Plot 3.1. и Sigma Plot 10.1. (Systat Software Inc – SSI, A scientific Data Management Company) и прилагане на теста на Стюдент (Student's t-test). Коефициентът на корелация (R) бе определен чрез използването на Excel (Microsoft Office Excel, 2003).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Получаване на *in vitro* култури

1.1 Обеззаразяване на растителния материал. Обеззаразяването на изходния материал при културите за микроразмножаване *in vitro* е особено важна стъпка.

Обеззаразяване на семена от *Rhodiola rosea*. За обеззаразяване на семената бяха използвани 6 схеми, включващи различни комбинации от стерилизиращи агенти (таблица 7).

Таблица 7. Ефективност на обеззаразяване на семена от *Rhodiola rosea* L.

Схема №	Дезинфектанти	Брой заложи	Обеззаразени семена [%]	Развитие на семената [%]
Семена съхранявани 1 година при стайна температура – „стари“				
1	96° C ₂ H ₅ OH за 5'	60	0	0
2	70° C ₂ H ₅ OH за 3'; 20% белина за 15'	60	0	0
3	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; белина за 5'	80	100	0
4	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; белина за 10'	80	100	0
5	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; 0.2% HgCl ₂ за 10'	80	100	0
6	70° C ₂ H ₅ OH за 3'; 20% белина за 20'	80	100	0
Семена използвани в годината на образуването им – „свежи“				
1	96° C ₂ H ₅ OH за 5'	60	0	0
2	70° C ₂ H ₅ OH за 3'; 20% белина за 15'	100	100	96.0
3	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; белина за 5'	100	100	26.0
4	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; белина за 10'	80	100	23.7
5	70° C ₂ H ₅ OH за 1'; 0.2% HgCl ₂ за 10'	80	100	22.5
6	70° C ₂ H ₅ OH за 3'; 20% белина за 20'	80	100	0

При използването на „стари“ семена се достигна до 100 % обеззаразяване при прилагането на схеми 3, 4, 5 и 6, но без последващо покълване. При „свежите“ семена добавянето на белина (схема 2) в поредицата от прилагани агенти доведе до 100 % обеззаразяване с много висок процент (96%) на понататъшно развитие на семената. На схеми номер 3, 4 и 5 се наблюдаваше ниска кълняемост (26 %, 23.7 %, 22.5 %, съответно). При обеззаразяване на семената със 70 % разтвор на етилов алкохол с последващо използване на 20 % разтвор на белина (2.2 % активен хлор) (схема 6), процентът на обеззаразените „свежи“ семена достигна до 100 %, но не покълнаха, а прилагането на същата схема (схема 6) при семената, които бяха съхранявани една година доведе до нулево обеззаразяване (таблица 7).

Обеззаразяване на експланти от диви растения *Rhodiola rosea*. По отношение обеззаразяването на различни експланти от възрастно растение бяха получени различни резултати, зависещи от типа на експлантата. Бяха прилагани 6 схеми от различни концентрации и комбинации на стерилизиращи агенти (таблица 8).

В проведените експерименти с експланти от диви растения само две схеми (№3 и 6) от приложените осемнадесет различни комбинации от детергенти и експланти, доведоха до успешно обеззаразяване и развитие на експлантите с възможност за работа в *in vitro* условия. Връхните пъпки

и адвентивни пъпки бяха по-лесни за обеззаразяване за разлика от експлантите от коренище. От приложените 6 схеми при обеззаразяване на експлантите от коренище без пъпки прилагането на схеми 1, 2, 4, 5 и 6 не даде положителни резултати. Единствено при схема 3 при комбинацията от 15% белина (2.2% активен хлор) и 0.2% HgCl_2 беше постигнато обеззаразяване 21.66%, но експлантите не се развиха. Тези резултати са повече или по-малко очаквани, но въпреки ниската ефективност на обеззаразяването, те дават добри възможности за по-нататъшни изследвания.

Таблица 8. Ефективност на обеззаразяване на експлантите от дива растения *Rh. rosea*.

Растителен материал/ Експлантите от:	Схема №	дезинфектанти	Обеззаразен материал[%]	Развитие на експлантите [%]
Връхна пъпка	1	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'	0	0
Връхна пъпка	3	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 15% белина - 20' 0.2% HgCl_2 - 15'	100	100
Адвентивни пъпки	1	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'	0	0
Адвентивни пъпки	4	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 3% H_2O_2 - 5'; 0.2% HgCl_2 - 10'	34.56	0
Стъблен експлант	1	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ за 1'	0	0
Стъблен експлант	4	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 3% H_2O_2 - 5'; 0.2% HgCl_2 - 10'	45.35	0
Стъблен експлант	5	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 5'; 20% белина - 15'; 0.2% HgCl_2 - 15'	11.11	0
Пъпки от коренище	1	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'	0	0
Пъпки от коренище	2	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 3'; 20 % белина - 15'	0	0
Пъпки от коренище	3	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 15% белина - 20' 0.2% HgCl_2 - 15'	0	0
Пъпки от коренище	4	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 3% H_2O_2 - 5'; 0.2% HgCl_2 - 10'	0	0
Пъпки от коренище	6	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; белина - 17'	62.07	34.48
Коренище	1	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'	0	0
Коренище	2	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 3'; 20 % белина - 15'.	0	0
Коренище	3	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 15% белина - 20'; 0.2% HgCl_2 - 15'	21.66	0
Коренище	4	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1'; 3% H_2O_2 - 5'; 0.2% HgCl_2 - 10'.	0	0
Коренище	5	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 5'; 20% белина - 15'; 0.2% HgCl_2 - 15'	0	0
Коренище	6	70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 1' ; белина - 17'	0	0

Нашите резултати потвърдиха трудностите, които се наблюдават при обеззаразяването за получаване на чист, свободен от патогени изходен материал, когато се работи с диви видове, взети от естествените им находища. В тази поредица от експерименти само една четвърт от приложените схеми доведоха до успешно обеззаразяване на експлантите предимно от връхни пъпки, което позволи понататъшното провеждане на *in vitro* експерименти.

1.2. *In vitro* отговор на растителен материал и семена от дива растения *Rh. rosea*

In vitro отговор на експлантите от дива растения златен корен. В нашата първа поредица от експерименти експлантите от дива растения бяха култивирани на различни хранителни среди за индуциране на калусогенезис и органогенезис. Изборът на експлант зависи от вида на използваното растение и от това кой от описаните методи е най-подходящ. Сезонът, възрастта и фазата на развитие на родителското растение имат важно значение за определяне реакцията на експланта, включително и вида на органа, от който е взет.

Експлантите, които бяха успешно обеззаразени бяха култивирани на 15 варианта хранителни среди на базата на Мурасиге и Скуг с вариране на фиторегулаторите и органичните добавки. Бяха наблюдавани различни модели на развитие (таблица 9).

Таблица 9. Култивиране на експланти от възрастно растение *Rhodiola rosea* L.

Експлант	Хранителна среда	Култивиране (дни)	Заразени [%]	Развити [%]	Особености
Стъбло	MSZ	40	0	0	
	MSDK	40	0	0	
	MSB	40	0	0	
	MSI	40	0	0	
Сегмент коренище без пъпка	MSD	40	0	0	
	MSP	40	0	0	
	MSD	40	0	0	
	MSD1	40	0	0	
	MSB	40	0	0	
	MSDK	40	0	0	
	MSDK1	40	0	0	
	MSZ	40	0	0	
	MSI	40	0	0	
Пъпки от коренище	MSDK1	30	47.67	53.33	Образуване на листна розетка
	MSI	30	0	51.72	Образуване на листна розетка
	MSI2	30	0	20.00	Образуване на листна розетка
	MSZ1	30	0	62.50	Растение
Върхна пъпка	MSBI2	40	0	100	Разрастване и образуване на калус в основата
Листен възел	MSBD	40	0	0	
	MSDI2	40	0	0	
	MSDI3	40	0	0	

В тази поредица от експерименти беше наблюдаван разбичен *in vitro* отговор – калусоподобни образувания, калуси, розетка, растения при използване на значителен брой (21) от комбинациите от експланти и хранителни среди. Независимо от това индукцията на калусогенезис и органогенезис не беше удовлетворителна за използването ѝ за микроразмножаване и получаване на вторични метаболити. Поради това нашите следващи изследвания бяха насочени към използване на *in vitro* получени кълнове за изолиране на експланти.

1.3. *In vitro* отговор на експланти изолирани от кълнове

1.3.1. *In vitro* развитие на семена и кълнове.

Кълняемост на семената в *in vitro* условия. Семената на *R. rosea* са много малки с размери 1.5-2.0 mm дължина и 0.3 – 0.6 mm дебелина. Кълняемостта им в естествени условия е много ниска 2 - 35 % (Саратиков и Краснов, 1987; Galambosi, 2006). Диворастящите видове имат слаба възстановителна способност, растенията не образуват добра коренова система и загиват в различни стадии от развитието си (Platikanov and Evstatieva 2008).

За да увеличим способността на семената към покълване в *in vitro* условия, те бяха култивирани на хранителни среди с добавени от 5 до 150 mg/l гиберелинова киселина.

Таблица 10. *In vitro* кълняемост и развитие на “свежи” семена от *Rh. rosea* (обеззаразяване по схема 2)

Хранителна среда	Концентрация на GA ₃ [mg/l]	Развитие на семената					
		На 15 ден		На 20 ден		На 40 ден	
		Покълване [%]	Големина на кълна [mm]	Покълване [%]	Големина на кълна [mm]	Покълване [%]	Големина на кълна [mm]
Вода		0	0	12.86	8.0 ± 0.03	15.71	16.5 ± 0.10
MS0	0	28.02	15.2 ± 0.08	35.33	17.0 ± 0.09	37.3	17.0 ± 0.07
MSG1	5	51.72	20.0 ± 0.09	78.79	23.0 ± 0.09	94.48	25.0 ± 0.08
MSG2	10	46.88	13.6 ± 1.11	53.13	15.0 ± 0.08	65.63	15.0 ± 0.6
MSG3	25	51.61	18.9 ± 0.06	66.52	20.0 ± 0.06	71.61	20.0 ± 0.09
MSG4	50 ¹	38.46	8.8 ± 0.10	58.62	10.0 ± 0.08	63.08	10.0 ± 0.07
MSG5	50 ^{1,2}	67.36	11.5 ± 0.04	91.58	14.0 ± 0.06	95.78	14.0 ± 0.07
MSG6	100 ¹	63.33	14.2 ± 0.08	90.63	17.0 ± 0.08	93.75	18.0 ± 0.08
MSG7	100 ^{1,2}	77.42	10.5 ± 0.08	93.55	19.0 ± 0.07	96.78	20.0 ± 0.10
MSG8	150 ¹	50.00	8.0 ± 0.06	76.66	12.0 ± 0.09	83.33	12.0 ± 0.09

Легенда: ¹Захарозата е 30 g/l вместо 20 g/l; ²Агарът е 0.4 % вместо 0.6 %.; □ - нисък - □ - висок показател

Покълването на семената започваше на 7-я ден и продължаваше до 40-я ден от култивирането им, като кълняемостта им варираше от 15.71 % до 96.78 % в зависимост от състава на хранителната среда (таблица 10). Хранителни среди MSG5 и MSG7 съдържащи гиберелинова киселина във високи концентрации, съответно 50 mg/l и 100 mg/l бяха най-ефективни с 67.3 % и 77.42 % покълване на 15-я ден и 95.78 % и 96.78 % на 40-я ден. Въпреки това дори и при най-ниските концентрации на GA₃ (5 mg/l) може да се достигне 94.48 %, но с много по-ниски темпове (наблюдаваната кълняемост е на 40-я ден). Три седмици е оптимален срок за получаване на растителен материал подходящ за работа *in vitro*. Получените данни са окуражаващи за по-нататъшното използване на *in vitro* покълналите семена за изолиране на експлант за последващите *in vitro* експерименти за индуциране на органогенезис.

1.3.2. Индуциране на органогенезис



Фигура 1. Експлант изолиран от семена, покълнали *in vitro* и култивирани на хранителна среда за органогенезис.

Стъблените сегменти (съдържащи листен възел и прилежащите му листенца) и върхната пъпка, изолирани от кълнове (фиг. 1) бяха култивирани на модифицирани MS хранителни среди. Експлантите образуваха калус или нови пъпки на всичките 9 варианта изпитани среди, като съответният отговор се влияеше и от вида и от концентрацията на фиторегулаторите (таблица 11). Индуцирането на органогенезис с формирането на нови пъпки и/или малки растения варираше в границите между 40 % и 85 %. Средният брой растения от експлант беше от 1.82 до 3.4 в зависимост от състава на хранителната среда

Таблица 11. *In vitro* отговор на експланти изолирани от *in vitro* покълнали семена от *Rh. rosea* L. (отчетени на 20-я ден от култивирането).

Хранителна среда	Образуване на нови пъпки [%]	Среден брой пъпки от експлант	Големина на пъпките [mm]	Калусогенезис [%]
Стъблен сегмент с листен възел				
MS	55.00	1.53 ± 0.05	10.3 ± 0.08	0
MSB	85.25	пъпки	до 1.0	0
MSA	51.00	1.82 ± 0.39	1.0 ± 0.85	0
MSA1	55.00	2.00 ± 0.07	12.0 ± 0.90	0
MSZ1	85.00	3.40 ± 0.14	17.8 ± 0.12	0
MSZ2	78.00	2.19 ± 0.16	15.1 ± 0.11	0
MSI	65.00	2.20 ± 0.22	12.5 ± 0.27	0
MSI2	40.00	1.80 ± 0.24	10.1 ± 0.87	0
MSI1	0	-	-	54.62
Експлант от върхна пъпка				
MS	40.0	1.35 ± 0.06	10.2 ± 0.06	0
MSB	78.00	пъпки	до 1.0	0
MSA	60.50	2.10 ± 0.55	15.0 ± 0.18	0
MSA1	58.25	1.94 ± 0.40	11.5 ± 0.11	0
MSZ1	82.50	2.80 ± 0.09	12.1 ± 0.42	0
MSZ2	75.00	2.00 ± 0.12	14.0 ± 0.47	0
MSI	45.00	1.50 ± 0.15	10.0 ± 0.52	0
MSI2	30.00	1.85 ± 0.09	15.0 ± 0.94	0
MSI1	0	-	-	28.00

Най-добри резултати по отношение регенерационната ефективност (85 % и 78 %) както и среден брой растения от експлант (3.4 и 2.19), бяха наблюдавани при хранителните среди MSZ1 и MSZ2, съдържащи по 2 mg/l зеатин, 0.2 mg/l ИОК и 1000 mg/l или 0 mg/l съответно хидролизат на казеина. На тези среди растенията бяха и най-високи (15-18 mm) (фигура 2а и б).

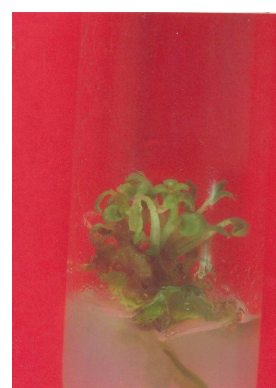
При използването на експланти от върхни пъпки, изолирани от кълнове, индуцираният органогенезис е в малко по-нисък процент (30 % – 82.5 %). Това важи и за средния брой получени пъпки/растения (1.5 - 2.8). За развитието на този тип експлант отново най-ефективна се оказва хранителната среда с добавен зеатин (MSZ1).



а



б



в

Фигура 2. *In vitro* размножени растения на хранителна среда: а) MSZ1, б) MSZ2 в) MSB1

Двата типа експланти (стъблен сегмент с листен възел и върхна пъпка, които бяха култивирани на хранителна среда MSI1, съдържаща високи количества 2-iP (3 mg/l) и АНО (0.6 mg/l), образуваха калуси с/или без дребни, миниатюрни пъпки без последващо развитие. Въпреки, че хранителна среда MSB е с добавен 2 mg/l БАП, култивирането и на двата типа експланти на нея доведе до образуването на много малки пъпки (големина до 1 mm) при 78-85 % от случаите. Това вероятно се дължи на по-високата концентрация БАП, който има такъв ефект при по-високи дози (Yin et al. (2004). За да стимулираме пъпките към растеж и регенерация бе намалена концентрацията на БАП в средата. След едномесечно култивиране на среда MSB тези пъпки бяха прехвърлени на хранителни

среди MSB1 и MSB2 с намалено количество БАП, съответно 1.0 mg/l и 0.5 mg/l (фигура 2в). Пъпките продължиха развитието си и достигнаха съответно големина средно 2.11 ± 0.03 cm и 1.78 ± 0.09 cm и удвоиха броя си (заложили 5 ± 0.07 пъпки и получени съответно 11.02 ± 0.09 и 12.43 ± 1.02 пъпки). В нашите експерименти беше използвана основна хранителна среда MS с голям брой природни и синтетични фиторегулатори с различна биологична активност. Нашите наблюдения за ролята на БАП при индуцирането на органогенезис са сходни с тези на другите автори.

Резултатите от нашите изследвания показаха, че видът на експланта изолиран от стъблото на донорното растение играе роля при *in vitro* размножаването. При повечето от изпитаните хранителни среди процентът на регенерация при връхните пъпки беше по-нисък, което се отнася и до средния брой регенеранти от експлант. При това част от връхните пъпки израстваха без да образуват адвентивни пъпки, осигуряващи по-висок процент на органогенезиса и по-голям индекс на размножаване. Подходящ експлант за работа би могъл да бъде получен от кълнове с оптимален размер 15 – 20 mm. Двата типа експлант регенерираха пъпки с висока ефективност над 80% на хранителни среди с добавен зеатин. Процентът на органогенезис беше подобен при хранителните среди с подобен състав. Класирайки хранителните среди от най-добрия към по-малко ефективен морфогенезис при стъблени експлант с листни пъпки редът би бил следния: MSZ1, MSZ2, MSI, MSA1, MSA, MSI2, а при експлантите от върхна пъпка - MSZ1, MSZ2, MSA, MSA1, MSI, MSI2.

1.3.3. Регенерация и микроразмножаване

Добре оформените пъпки, които продължиха растежа си и достигнаха височина 2-2.5 cm бяха прехвърлени на хранителна среда MSZ1 където се образуваха нови пъпки от основата на растенията. Развитието им продължи като за период от 3 седмици се образуваха от 3 до 6 нови растения с височина 4-6 cm. Растенията продължаваха да нарастват, като най-големите от тях бяха нарязвани на стъблени експлант с големина от 2-2.5 cm, като последните съдържаха и до 2 листни възела. Те бяха култивирани на хранителни среди MSZ1 или MSZ4 (съдържащи зеатин) за размножаване. Въпреки това коефициентът на микроразмножаване на двете среди беше два пъти по-висок във втори пасаж (от 6, а понякога и до 10 пъпки/растения от експлант). Поради по-ниската търговска цена на хранителна среда MSZ4, тя може да се счита за по-подходяща за масово микроразмножаване, позволявайки от един регенерант да бъдат получени от 200 до 500 растения за период от три месеца.

Интересно е да се отбележи, че коефициентът на размножаване варираше през различните сезони. Най-висока степен на пролиферация на пъпки беше наблюдавана през месеците май и юни, когато средният брой пъпки/растения от експлант достигна 6.78 ± 0.10 . По време на по-студените зимните месеци от октомври до март коефициентът на микроразмножаване беше сравнително по-нисък, а средният брой пъпки от експлант беше 2.11 ± 0.07 (във II-ри пасаж). По отношение на размножаването броят на регенерантите от един експлант при III пасаж достигна средно от 9 до 11 регенеранта.

1.3.4. Индуциране на ризогенезис и вкореняване на регенерантите

Растенията получени при микроразмножаването и достигнали големина 2.5 до 3.5 cm бяха култивирани на 8 варианта хранителни среди (таблица 12), съдържащи гиберелинова киселина в комбинация с различни концентрации на три ауксина (ИОК, АНО и ИМК).

Начало на коренообразуване се наблюдаваше от 10-я ден от залагането на експлантите. Най-висок процент ризогенезис 92 % и 95.62 % (представящ 159 % и 165 % в сравнение с контролата) беше наблюдаван съответно на хранителни среди MSR-4 и MSR-8. При тях и показателите по отношение на индукцията на корени (92% и 95%) и средната дължина на корена (2 и 2.13 cm, съответно) бяха най-високи (фигура 3). Двата варианта хранителни среди съдържат ИМК (2 mg/l) и ИОК (0.2 mg/l), което най-вероятно повишава ефикасността на ризогенезиса. Наблюдавана бе тенденция към позитивна корелация между нивото на ИМК и индукцията на корен ($71.42\%-85.0\%$). Подобна тенденция се наблюдава и по отношение дължината на корена. По-високият процент за формиране на корени на MSR-4 и MSR-8 среди, съдържащи едновременно ИОК и ИМК предполага синергичен ефект на тези два регулатора, влияещ върху процесите на клетъчния растеж и развитие.

Таблица 12. Вкореняване на растителни регенеранти от *Rhodiola rosea* L. (отчитане на 20-я ден от култивирането).

Хранителна среда	Култивирани експлант (брой)	Индуциране на ризогенезис [%]	Дължина на корена [cm]	Височина на растенията [cm]	Коефициент на размножаване
MSR-0	150	58.00	1.23 ± 0.08	3.22 ± 0.12	3.45 ± 0.14
MSR-1	275	85.00	1.95 ± 0.03	5.40 ± 0.09	3.62 ± 0.13
MSR-2	160	калус			
MSR-3	160	67.00	1.37 ± 0.08	3.33 ± 0.10	2.93 ± 0.06
MSR-4	265	92.03	2.00 ± 0.09	3.70 ± 0.08	5.59 ± 0.11
MSR-5	150	76.66	1.84 ± 0.07	4.22 ± 0.09	4.38 ± 0.13
MSR-6	150	73.33	1.57 ± 0.09	5.12 ± 0.07	4.82 ± 0.10
MSR-7	150	71.42	1.52 ± 0.10	4.75 ± 0.12	3.85 ± 0.08
MSR-8	450	95.62	2.13 ± 0.05	5.84 ± 0.13	6.78 ± 0.10

□ - нисък показател; □ - висок показател

Едновременно с процеса на образуване на корени, продължи и образуването на нови пъпки и растения. Получените резултати показват регенерация на растенията с различен коефициент на размножаване вариращ от 2.93 до 6.78 и различна височина на получените растения от 3.22 до 5.84 cm в зависимост от състава на хранителната среда. В единични случаи бяха наблюдавани и такива с височина от 9-10 cm. Най-добрите резултати превишаващи два пъти стойностите на контролата бяха получени отново на хранителни среди MSR-4 и MSR-8.

Стимулиращ ефект при мултиплицирането на растенията беше наблюдаван също така и при увеличаването концентрацията на ИМК в средата. По-ниските концентрации на гиберелиновата киселина оказаха положителен ефект при удължаването и архитектурата на регенерантите, които продължаваха своя растеж. При експлантите култивирани на хранителна среда MSR-4, където съдържанието на GA₃ е по-високо (1 mg/l) се наблюдаваше противоположната тенденция – получените растения бяха с около 1-1.5 cm по-ниски в сравнение от тези на вариант MSR-8 съдържащ 0.4 mg/l GA₃. В продължение на едномесечно култивиране те дотигнаха 8-10 cm, което способстваше по-лесното им прехвърляне в саксийки за аклиматизирането им.

Органогенетичните способности зависят не само от вида на експланта, но и от съотношението на фиторегулаторите в хранителната среда. За да изясним това взаимодействие между хранителна среда и експлант, беше проследено влиянието на фиторегулаторите върху процесите на покълване, размножаване и вкореняване при растения получени от покълнали на 4 варианта среди (MSG1 – MSG4), размножени на среда MSZ5 (съдържаща зеатин 2 mg/l, ИОК – 0.2 mg/l и GA₃ – 0.4 mg/l) и вкоренявани на 8 варианта хранителни среди (MSR-1 – MSR-8). Отчитаха се три показателя - процент индуцирани корени, дължина на корена и образуването на нови пъпки и/или растения.



Най-ефективен ризогенезис, касаещ процента на индуцирани корени (над 85 %) и дължината на корена (по-дълги от 2 cm) беше наблюдаван при първата схема, при която семената покълваха на хранителна среда MSG1, експлантите изолирани от семеначета се развиваха на хранителна среда MSZ5, ризогенезис беше индуциран на всички изпитвани варианти хранителни среди (варианти от MSR-1 до MSR-8). Що се отнася до най-добра хранителна среда за вкореняване – MSR-8 и MSR-4 бяха определени за първите две места (фигура 3). Двете хранителни среди съдържат 2 mg/l ИМК, 0.2 mg/l ИОК и гиберелинова киселина в различна концентрация, съответно 1 mg/l в MSR-4 и 0.4 mg/l в MSR-8.

Фигура 3. Вкореняване на *in vitro* размножени растения на хранителна среда MSR-8.

2. АКЛИМАТИЗИРАНЕ И АДАПТИРАНЕ НА РЕГЕНЕРАНТИТЕ ЗА РАЗВИТИЕ В *IN VIVO* УСЛОВИЯ (В ОРАНЖЕРИЯ И НА ПОЛЕ).

2.1. Адаптиране на растенията регенеранти в оранжерия.

Адаптацията на растенията, получени в *in vitro* култура в *ex vitro* условия е един от най-уязвимите и трудни етапи при разработването на протоколи за микроразмножаване. Много малък брой автори съобщават за успешно адаптиране на видове от род *Rhodiola* в *ex vitro* условия, като не срещнахме публикации за адаптиране на регенеранти в планински условия.

Нашите резултати показаха, че поддържането на относително висока въздушна влажност от 80 до 90 % в първите 5 – 15 дни от адаптирането е от изключителна важност за по нататъшното оцеляване и развитие на растението.

Растенията регенеранти вкоренявани на хранителна среда MSR-8 с големина 5-7 см и дължина на корена 2-3 см бяха изваждани от епруветките и засаждани в малки саксийки, съдържащи почва и/или перлит и/или торф. Видът на субстрата за вкореняване (почва, торф или перлит) имаше решаващо значение за по-нататъшното развитие и оцеляване на регенерантите.

Най-добра за адаптиране на регенерантите се оказа комбинацията почва:торф:перлит в съотношение 2:1:1. Най-благоприятни за растежа и развитието на растенията бяха температура 22-24° C, осветление 40 $\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ за 16/8 фотопериод и висока влажност на въздуха 90% и над 90% през първите седмици от адаптирането (фигура 4). При тези условия преживяемостта на растенията достигна 60% и беше възможно тяхното по-нататъшно развитие в оранжерия (фигура 5) или в планината при естествени условия. Поддържането на висока влажност на въздуха в комбинация с подходящ субстрат за вкореняване е решаващ фактор за успешна адаптация, който е наблюдаван и от други автори (Ишмуратова, 1998).

Подробната схема за успешна адаптация беше следната:

1. Изваждане на растенията от епруветките и обилно измиване с вода и/или слаб разтвор на калиев перманганат.
2. Засаждане на растенията в малки саксийки (с диаметър 5-6 см) пълни с почва, торф и перлит и в съотношение 1:1:2. Запазване на въздушна влажност 95 %.
3. Постепенно намаляване на въздушната влажност като се откриват растенията за време от по 30 минути 3 пъти дневно.
4. Прехвърляне на растенията в по-големи саксии (d = 15 см) и пръскане с пулверизатор, поливане с вода и/или с течна хранителна среда $\frac{1}{2}$ MS съдържаща 0.4 mg/l GA_3 .
5. Преминаване на поливане само с вода и намаляване на поддържаната въздушна влажност до 40-50 %.



Фигура 4. Адаптирани регенеранти златен корен.



Фигура 5. Двугодишно растение регенерант отглеждано в оранжерия.

2.2. Адаптиране на растенията в естествени условия. След период от 2-3 месечно адаптиране на растенията в адаптационно помещение при контролирани условия, регенерантите бяха прехвърляни в оранжерия, където преживяемостта беше средно 85 %.

След период от 6 месеца тези растения бяха засадени в опитното поле на бившия Институт по ботаника към Българската академия на науките, в областта Беглика в Родопите, при 1525 м надморска височина, 3.8° С средна годишна температура и 1.002 мм средни годишни валежи. В тези естествени условия приблизително 70 % от тези растения преживяха зимните месеци. За запазването на растенията от зимните студове в района на Беглика те бяха зазимени чрез мулчирането им. С настъпването на пролетта (април месец) бе наблюдавана усилена вегетация и образуване на надземни добре оформени вегетативни стъбла и листа (от 2 до 5 броя), като през следващите два месеца растенията нараснаха, достигайки 10-12 см височина и продължиха своето развитие. Тези растения регенеранти цъфтяха, образуваха семена и формираха корени и коренища като дивите видове от естествените находища.

3. ИНДУЦИРАНЕ НА КАЛУСОГЕНЕЗИС ОТ ЕКСПЛАНТИ ОТ *IN VITRO* РАЗМНОЖЕНИ РАСТЕНИЯ.

3.1. Индуциране на калусогенезис. Процесите на дедиференциация на клетките в растителните експлантите и последвалото формиране на калусна тъкан и нейното нарастване, както и диференцирането на калуса и образуването на тъкани и органи са в пряка зависимост от взаимодействието на експланта с условията за *in vitro* култивиране (Verpoorte et al., 2002). Биосинтезът на някои метаболити също се влияе от състава на хранителната среда (Yoo et al., 2008). В тази връзка и поради разнородните данни в литературата, в нашите изследвания бяха изпитани голям брой хранителни среди с добавени в различни комбинации и концентрации фиторегулатори и аминокиселини. Листните експлантите от *in vitro* размножени растения *Rhodiola rosea* бяха култивирани върху MS хранителна среда с добавени различни концентрации на ауксини и цитокинини. Върху половината от тестваните хранителни среди (9 варианта) се беше образувал калус в течение на 4 седмици. (Таблица 13).

Индуцирането на калусогенезиса стартира с уголемяване и нарастване на експлантите, като постепенно обхващаше цялата им повърхност. Най-висок процент при формирането на калус (от 62.85 % до 73.17 %) беше наблюдаван на два варианта хранителни среди съответно вариант 3 и 4, като и двете среди съдържат по 1 mg/l БАП и същото количество от 1 mg/l 2,4-Д или два пъти по-малко - 0.5 mg/l (при вариант 4) (таблица 13). Тези две комбинации на растежни регулатори се оказаха по-малко ефективни при индуцирането на калус, когато в хранителната среда се добави казеин хидролизат (1 g/l) (вариант 7 и 8). Калусогенезисът е по-малко ефективен когато нивата на цитокинините са по-малки от тези на ауксините в хранителната среда (0.5 mg/l БАП в сравнение с 1 mg/l 2,4-Д във вариант 5). В този случай по-дългото време за култивиране не оказва влияние върху индуцирането на калуси. Калусогенезис не беше индуциран в никой от вариантите хранителни среди съдържащи 2-iP (вариант 13, 14, и 15), ИОК в комбинация с БАП (вариант 12) и в повечето от вариантите съдържащи АНО (вариант 8, 9, и 10). Дедиференциацията на тъканите в експлантите беше стопирана при два варианта хранителни среди съдържащи високи концентрации от 2.0 mg/l на БАП и 2,4-Д.

3.2. Растеж и характеристика на калусите.

Темпът на растеж и характеристиката на калуса варираха в зависимост от състава на хранителната среда (таблица 13). В по-голямата част от изпитваните варианти хранителни среди се наблюдаваше тенденция на положителна корелация между ефективността на калусната индукция и растежа на калусната тъкан.

Комбинацията от БАП и 2,4-Д (варианти от 3 до 7) беше по-ефективна за нарастването на калуса, като теглото му варираше при отделните варианти и беше от 373 mg до 475 mg (фигура 6). В тази група най-добра бе комбинацията на БАП и 2,4-Д в съотношение 2:1 (вариант 4).

Добавянето на казеин хидролизат има различен ефект върху индуцирането и растежа на калусната тъкан. През периода на индуцирането казеин хидролизатът може да намалява калусното тегло, например при вариант 7 сравнен с вариант 4 или да го повиши - вариант 6 сравнен с вариант 3.

Бе установено, че най-добрата комбинация от растителни фиторегулатори благоприятства калусния растеж беше 1 mg/l БАП с добавено двойно по-малко количество 2,4-Д - 0.5 mg/l (вариант 4).

Таблица 13. Ефективност на калусогенезиса и характеристика на калусната тъкан на 30-я и на 45-я ден от култивирането.

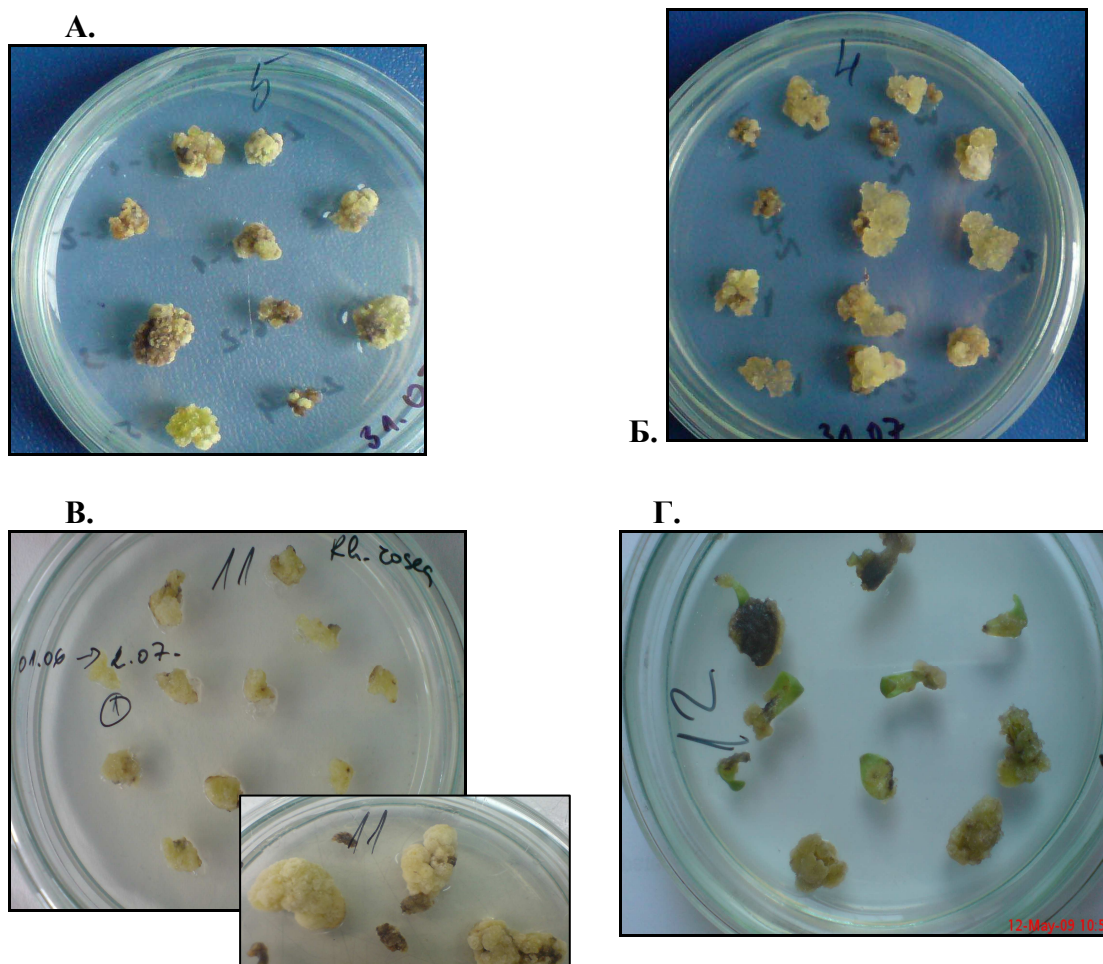
Храни телна среда	Индуциране на калус [%]		Свежо тегло на калуса $X \pm m$ [mg]	Съотношение сухо/свежо тегло [%]	Особености (характеристика) на калуса
	На 30 ден	на 45 ден			
1. MS	0	0	-	-	Некротирани жълтеникави експланти
2	0	0	-	-	Експлантите почерняват, калусоподобни, воднисти структури
3	62.85	62.85	345 ± 1.79 a,c	9.22	80 % мек, калус с блед цвят, 20 % лепкав калус с водниста структура и кафеникав цвят.
4	73.17	73.17	476 ± 3.4 a,b,d,f	7.35	Зърнест компактен калус, блед цвят с червени точки.
5	43.90	46.34	373 ± 3.6 b	7.50	62 % компактен калус; 38 % , лепкав воднист калус
6	54.17	70.83	379 ± 3.61 j	11.48	Компактен, зърнест калус, вледо-жълтеникав до бежов цвят.
7	45.45	81.81	415 ± 1.19 c,d,e, j	8.02	Мек, зърнест калус, бежово-зелен цвят
8	0	0			Некротирани жълтеникави експланти
9	0	0	-		Почерняване на експлантите
10	0	0	-		Почерняване на експлантите
11	58.06	58.06	428 ± 2.21 e	13.01	Компактен зърнест калус, бледо-жълтеникав цвят.
12	0	0			Некротирани експланти.
13	0	0	-		32 % зелени експланти без развитие, 68% некротирани жълтеникави експ
14	0	0	-	-	Почерняване на експлантите
15	0	0		-	Почерняване на експлантите
16	30.77	34.61	272 ± 2.1 g	10.22	Лепкав воднист калус; 65.39% - почерняване на експлантите.
17	16.66	16.66	372 ± 3.25 f,g,h	8.95	Лепкав воднист калус, бяло-бежов цвят; 83.34 % - почерняване на експлантите.
18	24.39	48.78	315 ± 1.12 h	8.89	Зърнест, воднист калус; светло бежов цвят.

a, b, c, d, e, f, g, h, j – разликата е статистически достоверна при $P > 0.001$

Калусът беше поддържан и наблюдаван в течение на 6 месеца, като през този период беше прехвърлян на всеки 20 дни на същата (първоначална) хранителна среда. Калусите получени на вариант 4, 6, 7, 11 и 18 показаха бърз растеж, увеличавайки теглото си 3-4 пъти по време на всяко субкултивиране. Тези тъкани се оказаха по-податливи за поддържане в по-дълъг период от време и може да се считат за по-удачни при акумулиране на биомаса или за други проучвания за изучаване и манипулиране на биосинтетичните пътища. Тук присъствието на казеин хидролизата в средата благоприятства пролиферцията в „long-term” калусната култура за разлика от ролята му в хранителните среди при индуциране на калусогенезиса.

Един от параметрите, които представляват интерес за екстракции на ценни вещества е съотношението на сухата маса на калусната тъкан спрямо свежото тегло. В проведените експерименти стойностите на сухата калусна маса варират и са в зависимост както от калусната структура и консистенция (плътност), така и от състава на хранителната среда (таблица 13).

Загубите на вода са сравнително по-малко при калусите с компактна и зърнеста структура, развиващи се на хранителни среди 4, 5 и 7, където съотношението на сухото тегло спрямо свежото е с най-малка стойност, съответно, 7.35 %, 7.5 % и 8.02 %. Изсушаването е по-бавен процес при калусите с мека, водниста структура (варианти 3, 16, 17 и 18), където тази стойност беше и най-висока, съответно 9.22 %, 10.22 %, 8.95 % и 8.89 %. Тези две групи калусни тъкани се различават както по съдържанието на фиторегулаторите в хранителните среди, на които са получени така и по техните концентрации.



Фигура 6. Калусни тъкани на 40-ят ден от култивирането им на хранителна среда:
А. - вариант № 5; **Б.** – вариант № 4; **В.** – вариант № 11; **Г.** - вариант № 12;

Настоящото изследване е пионерно при изследване възможностите за получаване на “long-term” калусни култури при българския екотип златен корен. Експериментите доведоха до определяне на подходящия състав на хранителните среди, необходими за развитието на калусни култури при това медицинско растение. Бяха определени оптималните комбинации и концентрации на фиторегулаторите за индукция и поддържане на калус със зърнеста структура, подходящ за продължително култивиране, което позволява натрупването на биомаса и биохимични анализи на ценни вторични метаболити. Препоръчителните комбинации и концентрации на фиторегулатори за индуциране на калус са БАП и 2,4-Д в концентрация съответно 1.0 mg/l и 0.5 mg/l. Добавянето в хранителната среда на хидролизата на казеина стимулира калусния растеж и забавя дехидратирането на калусните тъкани. Полученните данни показват важността от това да се намери оптималното взаимодействие между състава на хранителната среда, вида на експланта и генотипа за по-добро развитие в култура *in vitro* при видове представляващи интерес. Представените резултати обогатяват изследванията целящи използването на алтернативни методи за производство на ценни метаболити при видове от род *Rhodiola*.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НА *IN VITRO* КУЛТУРИТЕ И РАСТЕНИЯТА РЕГЕНЕРАНТИ.

4.1. Морфологична характеристика на растенията получени *in vitro* и продължили своето развитие в оранжерийни условия и в дивата природа.



Фигура 7. Корени и коренище на *in vitro* получени растения регенеранти преживели зимните месеци и отглеждани в оранжерия за една година.

Растенията регенеранти растящи в оранжерия прекараха зимните месеци и на пролет продължиха развитието си, като образуваха надземни вегетативни стъбла със сравнително ниска височина от 5-6 см. Коренището беше месесто и с размери като на дивите видове на тази възраст.

През първата година от адаптирането в планински условия (местността Беглика в Родопите), бе установено успешно развитие на 68 % на младите растения регенеранти след преминаване на зимните месеци. През месец април бе наблюдавана усилена вегетация и образуване на надземни вегетативни стъбла при *Rhodiola rosea*.

По отношение на добивите от *in vitro* размножени растения получените резултати бяха също така добри. При две годишни растения регенеранти и растения размножени чрез семена средното тегло на корените и коренищата бе 1.4 g за *in vitro* размножените растения и 1.16 g при екземпляри отгледани от семена. Съотношението корени спрямо коренище беше еднакво за двете изследвани групи и беше 45% : 55% в полза на коренището.

4.2. Цитологична характеристика на регенерантите растящи *in vitro*.

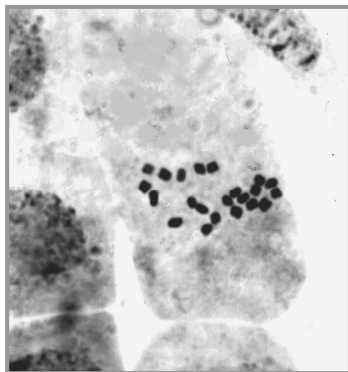
По литературни данни диплоидният брой на хромозомите в дивите видове *Rhodiola rosea* е $2n = 22$ (Löve and Löve, 1956; Беляева и Сипливинский, 1977; Жукова, 1980).

В резултат на серия от опити за приготвяне на “squash” препарати цялостната обработка на материала при изготвяне на временни цитологични препарати от *Rhodiola rosea* се извърши в следната последователност:

- 1) Предварително третиране на първични коренчета с: а) 0.05% разтвор на колхицин – 2½ часа;
- б) Измиване от фиксажната смес с дестилирана вода – 5 минути.
- 2) Оцветяване в смес от 4 % ацетоорсеин и 1N HCl в съотношение 9 : 1 за 45 минути.
- 3) Приготвяне на Squash препарата в капка 4 % ацетоорсеин.

Разработената методика бе приложена за цитологичен анализ на върхна коренова меристема от растения регенеранти, получени на среди за индуциране на органогенезис MSZ4 и за индуциране на ризогенезис MSR0, MSR-1, MSR-4, MSR-8. Бяха подбрани среди с различен състав на фиторегулаторите, за да се прецени влиянието им върху хромозмния състав. Бяха изследвани материали от по 20 растения регенеранти от всеки вариант хранителна среда.

Хромозомният брой в клетките на кореновите върхчета на всички изследвани *in vitro* регенеранти от *Rhodiola rosea* получени на различните хранителни среди беше константен и еднакъв с този на дивите растения, т.е. $2n = 22$ (фигура 8). Това показва, че подбраните от нас схеми за регенерация благоприятстват запазването на кариотипа. Получените цитологично идентични форми, съдържащи ценни биологично активни вещества ще бъдат използвани за възстановяване на изчезващите популации от вида както и за създаване на насаждения за целенасочено използване на растенията за получаване на фармакологично ценни вещества.



Фигура 8. „Squash” препарат на меристемни клетки от коренови връхчета на растения регенеранти от *Rhodiola rosea*, показващи диплоиден набор хромозоми, $2n = 22$.

5. ФИТОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА *IN VITRO* РЕГЕНЕРАНТИ, ДИВОРАСТЯЩИ РАСТЕНИЯ И КАЛУСНИ КУЛТУРИ ОТ *RHODIOLA ROSEA*

5.1. Изследване съдържанието на салидрозид по фармакопееен (количествен) метод в растения получени *in vitro*.

Количеството на основния биологичен комплекс от активни вещества в корените и коренищата на дивите видове *Rhodiola rosea* е различен и варира в зависимост от екологичните условия за обитаване от растенията. За количествено определяне на салидозида (основният компонент в полифенолния комплекс, отговорен за биологичното действие на вида) бе използван фармакопееен метод, описан в Государственная фармакопея СССР, 1989).

Количествен анализ на in vitro корени. Не беше установено наличие на салидрозид в едномесечните корени от *in vitro* растения регенеранти, получени на хранителни среди MSZ4 и MSZ8.

Количествен анализ на in vitro получени растения. За анализ бяха взети проби от корени и коренище на 1-но и 2-годишни *in vitro* получени растения регенеранти, отглеждани на експерименталното поле в областта Беглика, Родопите (таблица 14).

Таблица 14. Съдържание на салидорзида в корени и коренища на *in vitro* размножени растения *Rhodiola rosea*.

Проба	Растителен материал от:	Съдържание на салидорзид [%] $\bar{X} \pm SD$	Съдържание на салидорзид по отношение на дивите растения* [%]
Диворастващи растения			
1.	коренище от диворастващи растения на 1 година*	0.36 ± 0.0021	100
2.	корени от диворастващи растения на 1 година*	0.36 ± 0.0034	100
3.	коренище от диворастващи растения на 2 година*	0.44 ± 0.0048	100
4.	корени от диворастващи растения на 2 години*	0.38 ± 0.0032	100
<i>In vitro</i> регенерирали растения			
5.	коренище от регенеранти растящи в планината за период от 1 година	0.64 ± 0.0042	178
6.	корени от регенеранти растящи в планината за период от 1 година	0.62 ± 0.0041	172
7.	коренища от регенеранти растящи в планината за период от 2 години	0.61 ± 0.0026	139
8.	корени от регенеранти растящи в планината за период от 2 години	0.53 ± 0.0047	140

Легенда: * корени и коренища получени от растения развиващи се от семена в планината

Съдържанието на салидрозид във всички изследвани проби от реинтродуцирани растения беше по-високо в сравнение със стойностите на 1 и 2-годишни възрастни растения развили се от семена. То беше 1.72 и 1.78 пъти повече съответно в корените и коренищата на 1-годишните растения, а при

2-годишните регенеранти бяха 1.40 и 1.39, съответно за пробите от корени и коренище (таблица 14). Съотношението на количеството салидрозид в корените спрямо тези в коренището в двете *in vitro* групи беше много близко - 49.2 % спрямо 50.8 % в едногодишните регенеранти и 46.5 % спрямо 53.5 % в двегодишните регенеранти. Това съотношение не се различава съществено от съответните стойности на растенията получени от семена, където то е 50 % на 50 % за едногодишните растения и 46.3 % и 53.7 % за двегодишните растения.

Динамика и натрупване на салидорзид. Използвайки същия метод беше изследвана и динамиката на натрупване на салидрозид в растения регенеранти през различните сезони. Пробите от корените и коренищата бяха взети от растения, получени *in vitro* и култивирани 1 година на експерименталното поле в областта Беглика, Родопите. Беше установено, че количеството на салидрозид е 0.54 % за есенните (септември) и 0.67 % за пролетните проби (април). Тези количества не се отличават от тези на *in vivo* отглежданите растения на същата възраст.

5.2. Изследване съдържанието на салидрозид, розарин, розавин и розин в растения, получени *in vitro* и в калусни култури чрез високо-ефективна течна хроматография (HPLC)

За количествено определяне на основния полифенолен комплекс (салидрозид, розавин, розин и розарин) в калусните тъкани и в растения регенеранти (1-но и 3 годишни) беше използвана високоефективна течна хроматография (BETX, HPLC), която в световен мащаб е приета за най-точен метод при определяне на основните биологично активни вещества, особено когато се предполага производство на фарамацевтични препарати от вида.

Таблица 15. Съдържание на основния биологично активен комплекс в регенеранти и калуси изследвано чрез BETX (в %).

Биологично активни вещества	Съдържание на биологично активни вещества [%]					
	контрола* (М+Ж)	Калусни култури (4,5,6,7,18)	К	К1	К1.1 (М+Ж)	К2 (М+Ж)
Салидрозид	0.8	0	0	0.4	0.5	1.18
Розарин	0.8	0	0	0.9	0.9	1.0
Розавин	2.2	0	0	3.2	3.2	3.3
Розин	0.4	0	0	0.2	0.2	0.2
Общо розавини	3.4	0	0	4.3	4.3	4.5

Легенда: Контрола* - 3-годишни диви растения (М+Ж) по литературни данни (Evstatieva et al. (2008); К – корени на 1-но месечни *in vitro* регенеранти; К1 – корени и коренище от едногодишни регенеранти, отглеждани в оранжерия ; К1.1 – корени и коренище от едногодишни регенеранти, отглеждани в м. Беглика, Родопи; К2 – корени и коренище от 3 годишни регенеранти, отглеждани в м. Беглика, Родопи;

Прието е, че фармакопееият стандарт за наличие на розавини (розарин, розавини и розин) и салидрозид е съответно 3 % и 0.8 % т.е. съотношението на тези съединения трябва да бъде поне 3:1 в полза на розавините. От проведените изследвания се вижда, че при екстрактите получени от корени и коренища от едногодишни регенеранти *Rh. rosea* (К1), отглеждани в оранжерия това съотношение е: розавини 4.3 : 0.4 салидрозид, т.е. 10.75 : 1. Известно, е че в младите растения количествата на салидорзид са ниски, като той се натрупва с годините (Evstatieva and Revina, 1986). При екстрактите от корени и коренища от едногодишни регенеранти (К1.1) отглеждани в м. Беглика, тези стойности са все още извън контролни норми, съответно 4.3 : 0.5, т.е. 8.6 : 1. Това се вижда и в пробите на изследваните 3-годишни регенеранти. Анализиранието на екстрактите от корени и коренище на проба К2 от регенерантите показват съотношение на розавини спрямо салидрозид 3.75 : 1, със съответни стойности от 4.5 % и 1.18 % (табл. 15), което надвишава фармакопееия стандарт.

Тези резултати показват, че получените растения са перспективни и могат да бъдат използвани като суровина във фармацевтиката за производство на лекарствени препарати.

5.3. Антиоксидантна активност (съдържание на общите феноли, флавоноиди и антирадикалова активност) в *in vitro* култури при *Rhodiola rosea*.

В организмите съществуват редица системи за обезвреждане на свободните радикали, които се делят основно на ензимни и неензимни - чрез антиоксиданти.

Антиоксидантната активност в различните тъкани и органи, не само на дивите, но и на *in vitro* култивирани растения *Rh. rosea* се дължи на 4 фенолни компонента (салидрозид, розарин, розавин и розин), идентифицирани чрез HPLC (Furmanowa et al., 1998). В проучването се търсеха условията за *in vitro* култивиране стимулиращи продуцирането на биологично активни вещества. Ето защо освен изследваните регенеранти бяха анализирани и калусни тъкани, получени на различни варианти хранителни среди (таблица 16).

При пробите от калуси, най-високо съдържание на общи феноли беше открито при проба 18 и проба 6, съответно 5.18 mg/g и 4.98 mg/g (таблица 16). Двата вида калуси са получени на хранителни среди различаващи се по съдържанието на фитохормоните в тях. Калусните тъкани се различават по структура, но имат еднакъв бежов цвят. Проби 4 и 7 имат почти еднакво съдържание на феноли, съответно 4.51 mg/g и 4.62 mg/g. Тези две калусни тъкани се различават по цвят и консистенция, като първият бе зърнест, компактен и бял калус, а вторият бе бежово-зелен мек калус.

Флавоноидното съдържание в корените на регенерантите от *Rh. rosea*, растящи в оранжерия и в природата беше съответно 9.50 mg/g и 12.48 mg/g, докато тези в калусните тъкани бяха значително по-ниски (от 10 до 20 пъти) с различни стойности, вариращи между 0.21 и 1.40 mg/l. Установено беше, че съдържанието на флавоноиди в калусните тъкани е най-високо в проба 18, докато най-ниско беше при проба 5, съответно 1.40 mg/g и 0.21 mg/g. Тези резултати са аналогични на крайните стойности получени в предишните изследвания за съдържанието на феноли в калусните тъкани на вариант 5 и вариант 18.

Таблица 16. Общи феноли, флавоноидно съдържание и антирадикалова активност на екстракти от корени и калуси на *Rh. rosea*

проба	C _{GAE} ^A ± SD [mg/g]	C _{QE} ^B ± SD [mg/g]	IC ₅₀ ^C ± SD [mg/ml]
K1 корен	49.15 ± 0.14	9.50±0.03	0.030± 0.06
K2 корен	56.11 ± 0.16	12.48±0.03	0.015± 0.08
Калус 4	4.51 ± 0.01	0.61± 0.04	2.37 ± 0.07
Калус 5	3.39 ± 0.18	0.21± 0.04	2.94 ± 0.04
Калус 6	4.98 ± 0.18	1.20± 0.03	1.93 ± 0.03
Калус 7	4.62 ± 0.18	1.09± 0.04	1.97 ± 0.03
Калус 18	5.18 ± 0.20	1.40± 0.05	1.91± 0.03

^A Общо фенолно съдържание изразено в милиграми еквивалент на галовата киселина (C_{GAE}) в 1 g растителен материал; ^B Съдържание на флавоноиди изразено в милиграми еквивалент на кверцетина (C_{QE}) в 1 g растителен материал; ^C IC₅₀ - концентрацията на екстракта (mg/ml), която инхибира 50% от образуваните DPPH радикали; K1 – корени от регенеранти *Rh. rosea* получени *in vitro* и отглеждани 1 година в оранжерия; K2 – корени от регенеранти *Rh. rosea* получени *in vitro* и отглеждани две година в планината.

В настоящото изследване погасяващата способност на метанолните екстракти от калуси и корени на регенеранти *Rh. rosea* беше определена чрез способността им да обезцветяват разтвора на DPPH в зависимост от концентрацията.

Ефективността на изследваните екстракти беше изразена като IC₅₀, която е показател за антиоксидантна активност – колкото по-ниска е стойността ѝ, толкова по-висока е антиоксидантна активност. Като референти на антирадикаловата активност бяха използвани кафеена киселина и кверцетин, за които беше изчислена стойност на IC₅₀ (фигура 23). Както се вижда изследваните екстракти от корени K1 и K2 са по-слаби инхибитори на свободни радикали в сравнение с използваните референти със стойности на IC₅₀ 30.58 µg/ml и 15.18 µg/ml, съответно. Последните бяха изчислени чрез проследяване на зависимостта между процента на инхибиране на DPPH радикала и концентрацията на изследваните екстракти

Сравняването на данните получени от нашите биохимични анализи с тези на други изследователи е трудно, тъй като експериментите са провеждани с различни видове/генотипове Родиола, а също така са били използвани и различни методи.

Тези резултати показват, че антирадикаловата активност на всеки екстракт може да бъде свързана най-вече с количеството на фенолните и флавоноидните компоненти. Стойностите на IC_{50} на изследваните екстракти бяха сравнени също така със стойностите на приетите за стандарти антиоксиданти кафеена киселина (0.002 mg/ml) и кверцетин (0.005 mg/ml), както и с тези на екстракти от корени на регенеранти отглеждани в оранжерия и такива реинтродуцирани в дивата природа. При регенерантите измерените стойности бяха съответно 0.030 mg/ml и 0.015 mg/ml. Бе установено, че антирадикаловата активност в калусните тъкани е значително по-слаба в сравнение с тази на антиоксидантните стандарти и в екстрактите от корени на регенерантите *Rh. rosea*.

В проведеното изследване беше установена добра корелация между погасяващата радикалова активност на DPPH радикала и съдържанието както на общите феноли така и на флаваноиди в изследваните екстракти (проби). Показателна е връзката между антирадикаловата активност, изразена чрез концентрацията на екстракта и инхибиращата 50 % формирането на свободни радикали (IC_{50}), като се получава висок коефициент на детерминиране R^2 от 0.9199 за общите феноли и R^2 от 0.9342 за флаваноидите.

Настоящото изследване е пионерно по отношение изследването на фитохичните параметри на създадените калусни култури за продължително култивиране („long-term” култура) на българския екотип златен корен. Ниската степен на индукция и растеж на калуса, свързани с по-неблагоприятния състав на хранителната среда, може да е предпоставка за акумулиране на антиоксиданти. За първи път в България са определени фенолното/флавоноидното съдържание и антирадикаловата активност в калусни култури на *Rhodiola rosea*. Беше установена линеина корелация между съдържанието на общите феноли и погасяващата антирадикалова активност, както и между съдържанието на флаваноиди и погасяващата антирадикалова активност. Антиоксидантните свойства зависят до известна степен от състава на хранителната среда, използвана за култивиране на тъканите. Настоящите резултати обогатяват изследванията, спомагащи за търсенето и използването на алтернативни методи за производство на ценните метаболитни продукти, характерни за видовете от род *Rhodiola*.

6. ПРИЛОЖЕНИЕ НА *IN SILICO* МЕТОДИ ПРИ ПРОГНОЗИРАНЕ ИНДУЦИРАНЕТО НА КАЛУС И СЪДЪРЖАНИЕТО НА ОБЩИ ФЕНОЛИ, ФЛАВОНОИДИ И АНТИРАДИКАЛОВА АКТИВНОСТ.

Мотивите за провеждането на това изследване се базират на наложения стремеж към икономия на материали и ресурси, съчетани с търсенето на бързи резултати, което се ограничава от емперичния начин на подбор на условията за ефективен калусогенезис, но е във възможностите на биоинформатиката.

За изследването беше избран методът Невронни мрежи като подклас на Изкуствения Интелект. Изборът се основава на доказаната му ефективност в използването му за съставяне на прогнози и класификация въз основа на непълни и/или несигурни данни. Програмата EasyNN plus предоставя необходимия апарат, като позволява използването на електронните таблици, в качеството им на основен носител на информацията, необходима за прогнозите. Механизмът на верификация на резултата от “тренирането” на невронната мрежа е чисто статистически и в общия случай се основава на желаното ниво на грешка.

Прогнозирането на съдържанието на общите феноли, флавоноиди и антирадикалова активност в калусни тъкани, продукт на “*in silico*” методи при анализ на подадени хранителни среди се провеждаше на няколко етапа. Съгласно общия алгоритъм на работа, след направения анализ, стигнахме до следните изводи:

1. Подготвителен етап:

Тестов дизайн на различни варианти на таблиците с входно-изходна информация. На който бяха изпробвани 8 различни варианта за прогнози, т.е. бяха проектирани 8 различни стратегии за действие с характерните за тях таблици.

Установи се, че най-подходящо е:

- да се използва двуетапния модел на действие – прогнозираните данни да се използват за прогнозиране на данни;

- да се използва бинарна кодировка за данните за характеристика на калуса – цвят, структура и консистенция;

- архитектурата на невронната мрежа задължително трябва да включва две скрити невронни нива.

2. Същински етап:

За *подетап 1*: Прогнозиране на характеристиките на калусите въз основа на различните хранителни среди – тук се прогнозира структура, консистенция и цвят на калуса, процент индуциране на калус, свежо и сухо тегло на калуса.

За *подетап 2*: Прогнозиране на съдържанието на общи феноли, флавоноиди и антирадикаловата активност (IC_{50}), на базата на резултати, получени при определена част от хранителните среди от биологичния експеримент, цветовото разнообразие и характеристиките за калусна тъкан. В този етап за входни параметри се използват резултатите от подетап 1.

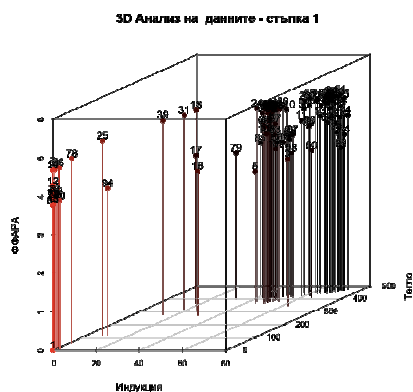
3. 3D PCA анализ (Principal Component Analysis) на данните.

3D PCA анализът беше проведен с помощта на програмата R*. Самият анализ включваше трикратно филтриране на всички използвани данни - тези от биологичния експеримент и прогнозираните.

- стъпка 1: анализ на всички прогнозирани данни, и определяне на филтри за по-фин анализ (фигура 9);

- стъпка 2: анализ на филтрираните прогнозирани данни, и определяне на филтри за по-фин анализ;

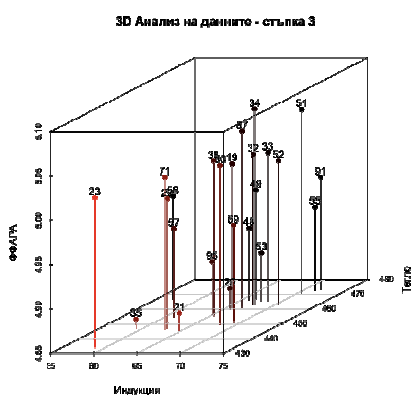
- стъпка 3: анализ на филтрираните прогнозирани данни, и определяне на средите, които дават най-качествените резултати (фигура 10).



Фигура 9. 3D PCA анализ на данните от Етап 2 – Стъпка 1.

Този анализ включва всички хранителни среди – оригинални и прогнозирани. Открояват се два “облака” от среди – червеният, който е с ниско качество и един двоен черен облак, с високо качество, т.е. при червения облак от среди получените калуси и прогнозираните ФФАР са в ниски стойности, докато при тези в двойния черен облак стойностите са високи.

За да се види какво точно включва втория (черен облак), направихме двойно филтриране на данните по следните критерии: 1) съдържание на феноли, флавоноиди и антирадикалова активност ≥ 4.8 ; 2) процент индуциране на калус ≥ 55 ; 3) свежо тегло на калуса ≥ 420 (фиг. 10)



Фигура 10. 3D анализ на данните от Етап 2 – Стъпка 3.

Тази фигура представлява групата от среди, получени след второто филтриране. Тези среди са отлични и могат да бъдат тествани в реална биологична среда.

Според нас не е необходимо допълнително филтриране, т.к. резултатите са напълно задоволителни.

Изводи от анализа. От проведения биоинформатичен анализ със 110 варианта хранителни среди, като най-ефективни бяха определени хранителни среди варианти 19, 20, 32, 33, 34, 37, 38, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 91 което представлява около 13 % от всички тестовни варианти. При тях съдържанието на общите феноли, флавоноиди и антиоксидантна активност беше най-високо, като

едновременно с това индуцирането на калус беше над 65 % на 30-я ден от култивирането, и надвишаваше 70 % на 45-я ден. Получените калуси се отличаваха и със сравнително високи тегла. Наличието на цитокинина БАП (1.0 mg/l) в комбинация с ниските концентрации на ауксините 2,4-Д (от 0.1 до 0.3 mg/l) и АНО (от 0.1 до 0.4 mg/l) в хранителната среда е най-подходящо за индуциране и поддържане на калусни култури. Влиянието на хидролизата на казеина върху съдържанието на фенолите, флавоноидите и антирадикаловата активност установен в биологичния експеримент се доказва и от проведения биоинформатичен анализ.

Добавянето на хидролизат на казеина в средата оказва положително влияние върху съдържанието на феноли (5.01 mg/g – 5.06 mg/g), флавоноиди (1.25 mg/g – 1.31 mg/g) и върху антирадикаловата активност (1.93 µg/ml – 1.95 µg/ml). Анализът показва също, че в рецептите на всички хранителни среди в който липсва добавката хидролизат на казеина съдържанието на феноли, флавоноиди и антирадикаловата активност е по-ниско. При 22 % от тестваните варианти на калуси, съдържанието на общите феноли беше под средната стойност (стойностите между 4 и 5 са приети за средни в това измерване), при 6.36 % стойностите бяха над средните, а при останалите тези стойностите на тези показатели бяха в средните граници.

По отношение връзката между структура/консистенция на калуса и производството на фенолите, флавоноидите и антирадикаловата активност беше намерено взаимодействие между тези параметри и това ясно може да се види на фигура 11. Калусите които са получени на условно казано „най-добрите“ среди и имащи най-високи нива на ФФАР са предимно със зърнеста структура, меки и с водниста консистенция или по-точно: 67 % от калусите имат зърнеста структура; 33 % са с „водниста“; 46 % са с консистенция „мек“, 33 % - „лепкав“.

По отношение връзката между цвят на калуса и продуцирането на ФФАР за разлика от биологичния експеримент където не беше открита връзка между тези показатели, биоинформатичният анализ откри корелация между тези параметри, като се установи, че тези стойности са най-добри при калуси със светъл, жълтеникав и/или светло-бежов цвят. Анализът потвърждава и резултатите от биологичния експеримент за влиянието на фиторегулаторите в средата, като се препоръчва концентрацията на цитокинина БАП да е по-висока спрямо тази на ауксина 2,4-Д.



Фигура 11. Графично разпределение по структура калусите, получени на „най-добрите“ среди.

Тук ясно се открояват следните групи калуси:
 67% са със зърнеста структура.
 33 % са с водниста консистенция
 46 % са с консистенция „мек“.
 16 % са с консистенция „лепкав“

При бъдеща верификация на получените данни препоръчваме да бъде намален обема на работа, съответно и цената на лабораторните консумативи, като бъдат тествани следните варианти хранителни среди 19, 32, 33, 34, 37, 38, 52, които съставляват само 6.36 % от всички изпитани среди. Тези среди могат да бъдат използвани и за получаване на биомаса с цел продуциране на феноли, флавоноиди или други ценни вторични метаболити.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В резултат от проведените експерименти със защитения медицински вид *Rhodiola rosea* са преодоляни трудностите при обеззаразяване на растителния материал и ниската кълняемост на семената от български екотип. Определени са най-подходящите експланти, получени от *in vitro* покълнали семена, осигуряващи надеждна индукция на калусогенезис и органогенезис. Установени са оптималните концентрации и комбинации от регулатори на растежа, осигуряващи дедиференциация и редиференциация. Получени са ефективни схеми за регенерация и микроразмножаване при златен корен (*Rhodiola rosea* L.), въпреки трудностите при работа с диви видове. Приложението на различни схеми (създадени по време на работата) за ефективно микроразмножаване, което се постига с

използването на голям брой хранителни среди, регулатори на растежа и видове експланти, позволява гъвкавост в настоящите и бъдещи изследвания. Тези схеми варират, както по продължителност на времето за изпълнение, така и по цена, включваща консумация на лабораторни химикали/материали и др. Препоръчителният протокол за микроразмножаване може да бъде със следната последователност на процесите: обеззаразяване на семената за 3 минути с етилов алкохол последвано от 20 % [об/об] белина за 15 минути и покълване на хранителни среди MSG1, MSG5 или MSG7 (съдържащи 50 - 100 mg/l гиберелинова киселина); размножаване на пъпки/растения от стъблени сегменти с листни междувъзлия, изолирани от кълнове или регенеранти, получени на MSZ1 или MSZ2 среди (съдържащи 1-2 mg/l зеатин), или за по-дълъг период на MSB1 или MSB2 среди (съдържащи 0.5 или 1.0 mg/l БАП); вкореняване на растенията на MSR-8 или MSR-4 среди (съдържащи ИМК и ИОК, съответно 2.0 и 0.2 mg/l), *in vivo* адаптация на смес от перлит, торф и почва в съотношение 1:1:2. Целият процес може да отнеме около 3 месеца: 20 дни за покълване на семената; 30 дни за размножаване или 20 дни за субкултивиране; 20 дни за вкореняване и 15 дни за адаптация. За този период над 100 регенеранта могат да бъдат получени от едно покълнало семе на златен корен. Всеки регенерант може да даде от 3 до 5 експланта, които да бъдат използвани за клонално микроразмножаване. Така могат да бъдат получени до 1000 нови растения за период от 6 месеца, чийто кариотип ($2n = 22$) е идентичен с този на диворастящите растения.

Пионерен е забележителният успех с адаптаирането на получените *in vitro* регенеранти в условията на високите части на планините, което не е съобщено до сега в световната практика. Това би позволило възобновяване и възстановяване на естествените находища и запазване на генфонда на защитения медицински вид златен корен.

Получени са нови данни при анализирането на корените и коренищата на 3-годишните регенеранти, отглеждани в планината. Резултатите показват по-високо съдържание на розавини и салидрозид (съответно 4.5 % и 1.18 %) в сравнение с диворастящите растения. Освен това, съотношението на тези съставки е 3.75:1, което е по-високо от фармакопеения стандарт от 3:1, което благоприятства използването на тези растения за лекарствени препарати. Акумулирането на биомаса посредством микроразмножаване и продуцирането на биологично активни вещества в получените *in vitro* регенеранти потвърждава възможностите на този екологично благоприятен биотехнологичен метод да бъде използван за продуциране на ценни съединения от *Rh. rosea*.

Пионерно за България е създаването на ефективна схема за продължително култивиране на калусни култури ("long-term" cultures) при златен корен, както и определянето на техните фитохимични свойства. Експериментите допринасят за откриването на точния състав на хранителната среда за развитие на калусни култури при този медицински вид. Определени са оптималните комбинации и концентрации от фиторегулатори за ефективно индуциране и поддържане на калус със зърнеста структура за продължително култивиране, позволяващи натрупване на биомаса и биохимичен анализ на ценни вторични метаболити. За индуциране на калус е препоръчително добавянето на фиторегулаторите БАП и 2.4-Д в концентрации съответно 1 mg/ml и 0.5 mg/ml. Добавянето на хидролизат на казеина стимулира калусния растеж и забавя дехидратирането на калусната тъкан. Ниският процент на индукция на калус и слабият растеж, свързани с по-неблагоприятната хранителна среда и съдържанието на фиторегулаторите, може да бъде предпоставка за по-голямото натрупването на антиоксидантни съединения.

За първи път в България бяха определени общото фенолно и флавоноидно съдържание и антирадикаловата активност в калусни култури на *Rhodiola rosea*. Беше установена линейна корелация между съдържанието на фенолите и антирадикаловата активност, както и между съдържанието на флавоноидите и антирадикаловата активност. Антиоксидантните свойства зависеха от състава на хранителната среда за култивиране.

За първи път в България и в света бе проведен биоинформатичен анализ при *Rhodiola rosea*. По оригинален начин от 110 съставени от нас хранителни среди и след компютърно тестване на вариантите чрез QSAR модели, бяха определени 13 % като най-добри по критерии индукция и нарастване на калуса и съдържание на общите феноли, флавоноиди и антирадикаловата активност. По отношение връзката между цвят на калуса и производството на антиоксиданти, за разлика от биологичния експеримент където не открихме връзка между тези показатели, биоинформатичния анализ откри взаимодействие между тези параметри, като се установи, че тези стойности са най-добри при калуси със светъл, жълтеникав и/или светло-бежов цвят. Анализът потвърждава и

результатите от биологичния експеримент за влиянието на фиторегулаторите в средата при индуцирането на калус, като препоръчва концентрацията на БАП да е по-висока спрямо тази на 2,4-Д.

Изследванията в настоящата работа обогатяват данните в световен и национален мащаб за изучаване и запазване на защитения медицински вид *Rhodiola rosea* чрез използване методите на „зелената“ биотехнология. Представените резултати обогатяват изследванията, целящи използването на алтернативни методи за производство на ценни метаболити при видове от род *Rhodiola*. Постиганията в областта на биоинформатиката, показват ефективността от взаимодействието на биологията и информатиката, което е в съответствие и със съвременните нужди на растителната биотехнология, изискваща по-ефективно, по-бързо, по-адаптивно и по-евтино създаване, размножаване и поддържане на растения с ценни качества, както и по-ефективен синтез на ценни и/или нови вещества за фармакологията.

V. ИЗВОДИ

Въз основа на получените експериментални резултати и тяхното обсъждане, могат да бъдат направени следните по-важни изводи:

1. Успешно обеззаразяване на семена и експланти, изолирани от диви растения, е постигнато чрез прилагане на няколко създадени схеми при последователно използване на етанол, белина и живачен двухлорид, при оптимални концентрации от 70 %, 20 % и 0.2 % съответно и третиране за 3, 15 и 10 минути, позволяващо получаването на *in vitro* култури при *Rhodiola rosea*.

2. Повишена е неколkokратно (96 %) кълняемостта на семената чрез култивирането им на хранителна среда съдържаща гиберелинова киселина (50 mg/l – 100 mg/l). Кълновете са най-подходящ изходен материал за изолиране на експланти за индуциране на органогенезис и регенерация на растения. Стъблените сегменти с листни междувъзлия са ефективни за образуване на адвентивни пъпки и бързо *in vitro* клониране, а листните експланти от *in vitro* регенеранти са най-добри за калусогенезис.

3. Установени са оптималните хранителни среди за индуциране на калусогенезис, органогенезис, регенерация и ризогенезис. За получаване на калус съществено значение имат фиторегулаторите БАП (0.5 mg/l – 1.0 mg/l) и 2,4-Д (0.5 mg/l – 1.0 mg/l), а за продължителното му поддържане („long-term” култура) е необходимо и добавянето на хидролизат на казеина (1000 mg/l). Образуването на пъпки се обуславя от БАП (1 mg/l – 2 mg/l) и заеатин (2 mg/l), като зеатинът значително увеличава индекса на мултиплициране. Формирането на корени се стимулира от комбинацията на ИОК (0.2 mg/l) и ИМК (2 mg/l).

4. Постигнато е микроразмножаване при *Rhodiola rosea*, като са създадени ефективни системи при използването на стъблени сегменти, изолирани от кълнове или регенеранти, култивирани на среди съдържащи зеатин (или БАП за по-дълъг период), индуциране на ризогенезис на среди съдържащи ИОК и ИМК. Растенията регенеранти са цитологично и морфологично идентични с дивите растения.

5. Адаптиране на растенията регенеранти в условия *ex vitro* е най-успешно в смес от перлит, торф и почва в съотношение 1:1:2 при температура 21-22 °C и влажност на въздуха 85 % – 90 %, което осигурява значителна преживяемост от 60 % в адаптационното помещение, 85 % в оранжерия и 68 % в планината. В естествени условия регенерантите не се отличават от дивите растения като цъфтят, образуват семена и формират корени и коренища.

6. Чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) е установено, че се синтезират важните за вида биологично активни вещества в корените и коренищата на растения регенеранти на две и три години, развиващи се в оранжерийни и в планински условия. Съдържанието на розавини (4.5 %) и салидрозид (1.18 %) в корените и коренищата е по-високо от фармакопеения стандарт 3:1. Не бяха

открити съединения от основния биологично активен комплекс в корените на едномесечни регенеранти и в калусни култури.

7. Установени са десетократно по-високи стойности на съдържанието на общите феноли и флавоноиди и антиоксидантната активност в корените и коренищата на регенерантите в сравнение с калусните култури, както и положителна корелация между изследваните вторични метаболити и антирадикаловата активност. Същевременно стойностите на тези параметри се влияят от състава на хранителната среда за култивиране на калуса.

8. Чрез биоинформатичен (QSAR) анализ на 110 съставени от нас хранителни среди бяха прогнозирани най-подходящите 14 варианта, осигуряващи ефективно индуциране и растеж на калуса, както и високи нива на общите феноли, флавоноиди и антиоксидантна активност. Анализът откри връзка между цвета на калуса и производството на антиоксиданти, което не беше установено в биологичния експеримент.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Преодолени са проблемите с обеззаразяване на растителен материал от *Rhodiola rosea* и ниската кълняемост на семената ѝ, което позволява получаване на *in vitro* култури при това защитено лечебно растение. Разработени са оригинални протоколи, системи и схеми за калусогенезис, органогенезис и регенерация при български екотип златен корен.

2. Създадени са ефективни системи за микроразмножаване при *Rhodiola rosea*, като за период от 6 месеца от едно покълнало семе се получават до 1000 регенеранта, морфологично и цитологично идентични с дивите растения. Успешното адаптапиране във високите части на планините, позволява системата да бъде използвана за алтернативно мултиплициране на растения за реставрация и консервация на застрашения вид.

3. За първи път в България е определено съдържанието на биологично активните вещества от *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo* култури и растения. По-високото от фармакопеения стандарт съдържание на розавини и салидрозид в тригодишни растения регенеранти позволява използване на този екологично чист биотехнологичен метод за получаване на растения продуценти на ценни съединения от медицинския вид златен корен.

4. За първи път в България и в света при *Rhodiola rosea* успешно са съчетани методите и подходите на биоинформатиката и биотехнологията за по-бързо, по-икономично и по-ефективно определяне на условията за натрупване на биомаса и продуциране на ценни вещества чрез иновативни технологии.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

В списания:

1. Tasheva K. and G. Kosturkova. 2010. Bulgarian golden root *in vitro* cultures for micropropagation and reintroduction. Central European Journal of Biology, vol. 5(6), 2010, p. 853-863 (IF: 0.915 za 2009)
2. Dimitrov B., Tasheva K., Zagorska N., Evstatieva L. 2003. *In vitro* cultivation of *Rhodiola rosea* L. Genetics and Breeding, v. 32 (1-2), p. 3 – 6.

В пълен текст от конференции:

3. Tasheva K., Zagorska N., Dimitrov B., Evstatieva L. 2003. *In vitro* cultivation of *Rhodiola rosea* L. International Scientific Conference, 75 years of the Forest Research Institute, BAS, Octobre 1-5, 2003, proceedings of scientific papers, vol. II, p. 161-165.
4. Bozhilova M., Evstatieva L., Tasheva K., 2008. Salidroside content in *in vitro* propagated *Rhodiola rosea* L. 5th conference on medicinal and aromatic plants of Southeast European countries (5th CMAPSEEC), 2 -5.09.2008 Brno Czech republic, Proceedings of scientific paper, p. 159 – 161.

Кратки съобщения и постери от конференции:

5. Tasheva K. 2009. Micropropagation as an alternative to conventional propagation of *Rhodiola rosea* L. 8th International Symposium "New development in green gene technology", 1-4 September, 2009 – Szeged, Hungary, p. 78.
6. Tasheva K., M. Petrova, N. Zagorska, L. Evstatieva, 2006. Plant regeneration *in vitro* of *Rhodiola rosea* L. IV Balkan Botanical Congress, 20-26 June 2006, Sofia, Bulgaria, p. 273

Цитирания свързани с дисертацията: 8



Искам да изразя дълбоката си признателност към моя ръководител и учител доц. д-р Георгина Костуркова.

Оценявам силно подкрепата на доц. д-р Елена Георгиева, без чиято помощ тази дисертация не би била възможна.

Благодаря на доц. д-р Люба Евстатиева, която предостави растителния материал и отглеждаше насажденията в планината, на доц. д-р Милка Подорова и на д-р Антоанета Прендафилова за полезните съвети и напътствия при осъществяването на фитохимичните анализи, а така също и на Валерия Симеонова (докторант в СУ) за всеотдайната помощ при извършване на биоинформатичните анализи.

Не мога да отмина и помощта на колегите ми от секция "Биотехнология на растенията" от Институт по физиология на растенията и генетика.

Благодаря на родителите ми, брат ми и семейството ми, както и на всичките ми приятели, без чиято вяра и подкрепа този труд нямаше да бъде осъществен.