



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

МАРИЯ ИВАНОВА ПЕТРОВА

**Биотехнологични подходи за размножаване, съхраняване и
получаване на биомаса от hairy roots при *Arnica montana* L.**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Професионално направление: 4.3. Биологични науки

Научна специалност: 01.06.06 „Генетика”

Научни консултанти:

Доц. д-р Ели Зайова

Доц. д-р Марияна Влахова

Рецензенти:

Проф. дн Аглика Едрева

Проф. д-р Венета Капчина-Тотева

София, 2013

Дисертационният труд е написан на 151 страници, съдържа 31 фигури и 34 таблици. Списъкът на използваната литература включва 392 заглавия, от които 5 на кирилица. Работата е обсъдена и насрочена за защита на разширено заседание на секция „Приложна генетика и биотехнология на растенията” към Институт по физиология на растенията и генетика, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 09. 12. 2013 г. от 14. 00 часа в залата на Институт по физиология на растенията и генетика, БАН (ул. “Акад. Г. Бончев” блок 21) на открито заседание на Научното жури, в състав:

Вътрешни членове:

- 1. проф. дн Аглика Едрева**
- 2. доц. д-р Ели Зайова (научен консултант)**

Външни членове:

- 1. проф. д-р Венета Капчина-Тотева**
- 2. доц. д-р Марина Станилова**
- 3. доц. д-р Антоанета Трендафилова**

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ИФРГ, БАН.

Авторефератът е отпечатан с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0025, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007–2013) и съфинансиран от Министерството на образованието и науката в Република България.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

БАП – 6-бензил аминоксипуридин

Кн - кинетин

2 иП – 2-изопентил аденин

ТДЗ - тидиазурон

2,4 Д – 2,4-дихлорфенокси оцетна киселина

ИОК – индолил-3- оцетна киселина

ИМК – индолил-3- маслена киселина

НОК – α -нафтил оцетна киселина

GA₃ – гибберелинова киселина

MS – хранителна среда по Murashige and Skoog (1962)

B5- хранителна среда по Gamborg et al. (1968)

SH- хранителна среда по Schenk and Hildebrandt (1972)

TIS- temporary immersion system, система за временно потапяне

OD – optical density, оптична плътност

PCR – polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

bp – base pairs, базови двойки

¹H NMR (¹H ЯМР)- Ядрено магнитен резонанс спектроскопия

GC/MS (ГХ/МС) – Газова хроматография/масспектрометрия

БАВ - биологично-активни вещества

ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на лечебните растения при профилактиката и лечението на редица заболявания води началото си от древността. И днес значението им за медицината и фармацията остава неоспоримо. Лечебните растения са богат източник на ценни биологично-активни вещества (БАВ). Понастоящем над 50 000 вида намират приложение за медицински цели. Лечебните препарати от растителен произход се отличават с добра поносимост и по-слаба токсичност в сравнение със синтетичните такива, което позволява един по-продължителен прием без риск от възникване на странични явления. Използваните в света медицински препарати изцяло или частично са създадени на базата на естествени източници, поради което много лечебни растения са сериозно застрашени от изчезване. Свърхсъбирането, въздействието на инвазивни видове, както и промените в климата оказват силно влияние върху разнообразието от лечебни растения в Европа. Необходимо е да се вземат специални мерки за осигуряване на условия за възпроизводство и устойчиво развитие на популациите от ценни видове. Ресурсният дефицит може да бъде преодолян чрез прилагане на съвременни биотехнологични методи. През последните години методът на растителните тъкани и клетъчни култури се разглежда като важен алтернативен начин за запазване на биологичното разнообразие и като източник на ценна суровина за получаване на БАВ. Възможността за стандартизиране на *in vitro* процеса, осъществяване на контрол върху отделните му етапи, повишаване съдържанието на важни метаболити при целогодишен гарантиран добив и състав са едни от основните предимства на този подход. Публикуваните научни разработки с лечебните растения, при които са приложени биотехнологични подходи могат да се отнесат към три основни групи: 1.) *in vitro* култивиране с цел мултиплициране и съхранение на ценен растителен материал; 2.) получаване на биомаса от диференцирана и недиференцирана тъкан; 3.) култивиране при условия, провокиращи промени във вторичния метаболизъм на растителната клетка. Един от най-ефективните методи за получаване на големи количества биомаса е генетичната трансформация с почвената бактерия *Agrobacterium rhizogenes*, при която се формират нетипични корени (hairy roots). Култури от hairy roots са постигнати при над сто растителни вида, включително и при някои застрашени лечебни растения. Трансгенните корени намират редица приложения: синтезиране на БАВ, експресия на рекомбинантни белтъци, регенерация на цели растения, функционален анализ на гени и други.

Arnica montana L. (Asteraceae) е ценно лечебно растение, което е силно антропогенно повлияно, въпреки, че е разпространено във високите части на планините, а част от популациите му са разположени в границите на защитени природни територии. Видът е включен в списъка на застрашените лечебни растения от приложението на Резолюция №338/1997 на Европейския съюз, имаща за цел опазване на растителните видове посредством контрол на търговията с тях. *A. montana* се ползва от най-древни времена в народната медицина и понастоящем намира широко приложение във фармацията и козметиката поради антисептичното си, противовъзпалително и антиоксидантно действие. Въпреки това редица въпроси, свързани с индуциране и характеризиране на *in vitro* култури и получаване на биомаса като алтернативен източник на БАВ при този вид все още не са решени. В България отсъстват системни и задълбочени изследвания на този застрашен вид, както и данни за прилагане на модерни биотехнологични и фитохимични подходи. Създаването на цялостна технология за размножаване, съхраняване и култивиране на *A. montana* е основна предпоставка за интродуцирането на вида в различни планински райони на България.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е проучване и оптимизиране на факторите, влияещи върху микроразмножаването, съхраняването и ефективността на индуциране на нетипични корени (hairy roots) при *A. montana*, както и установяване спектъра и нивата на някои от синтезираните вторични метаболити.

В съответствие с поставената цел са определени следните задачи:

1. Разработване на ефективни методи за микроразмножаване и продължително *in vitro* съхраняване на *A. montana*.
2. Индуциране на калусни култури, подходящи за продължително култивиране и за получаване на суспензии, синтезиращи ценни БАВ.
3. Растителна регенерация чрез индиректен органогенезис при *A. montana*.
4. Индуциране на бързорастяща култура от нетипични корени (hairy roots) на *A. montana* чрез трансформация с *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 като биомаса за получаване на ценни метаболити.
5. Проучване съдържанието на сескитерпенови лактони в *in vitro* и *in vivo* растителен материал от *A. montana*.
6. Газово хроматографски/маспектрометричен анализ на hairy roots от *A. montana*.
7. Аклиматизация при планински условия на *ex vitro* адаптирани растения

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Инициране на *in vitro* култури

I.1. Изходен растителен материал

Подбор на произход:

За въвеждане в култура *in vitro* като изходен материал са използвани семена от *A. montana* от три различни произхода, любезно предоставени от доц. д-р Л. Евстатиева и доц. д-р А. Виткова от Института по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания, БАН:

- Естествено находище на вида в Карпатите, Украйна – семената са събрани през 2006 г. от Украинските Карпати в Закарпатската област, Раховски район в околностите на село Квасы, разположен на рида Черногора.
- Ботаническа градина, Кемниц, Германия (234)
- Ботаническа градина, Виена, Австрия (4010000082)

Подбор на експлант за:

- Инициране на *in vitro* култури: надземна част на семеначета.
- Разработване на ефективен протокол за микроразмножаване: стъблени сегменти с прилежаща пъпка.
- Провеждане на опитите за продължително съхраняване на *A. montana* в условия *in vitro*: клонирани растения от трите проучвани произхода.
- Индуциране на калусни култури:
 - Сегменти от *in vitro* покълнали семеначета: котиледони и хипокотили
 - Сегменти от *in vitro* микроразмножени растения в активен растеж: лист

I.2. Обеззаразяване на изходния растителен материал

Семената са измивани с чешмяна вода и миеш детергент (течен сапун) преди дезинфекцията. Обеззаразяването е проведено с три стерилизиращи агента – 70% етилов алкохол (C_2H_5OH), 0.1% разтвор на живачен дихлорид ($HgCl_2$) и търговска белина (АСЕ, продукт на Procter & Gamble), съдържаща 5% активен хлор без разреждане. Приложени са следните схеми на стерилизация:

- 70 % C₂H₅OH за 5 min.
- 70 % C₂H₅OH за 2 min и 0.1% HgCl₂ за 3 min.
- 70 % C₂H₅OH за 1 min и търговска белина (ACE) за 10 min.

След 10 дневно култивиране е отчетен процентът на стерилните експлант и тяхното развитие при използваните схеми на стерилизация.

II. *In vitro* размножаване

II.1. Състав на хранителните среди за покълване на семената

Семената са третирани с разтвор на 0.03% гиберелинова киселина (GA₃) за 24 часа за стимулиране на кълняемостта им. Използвана е MS среда с витамини (Murashige and Skoog 1962). Покълването на семената е иницириано на хранителни среди, съдържащи GA₃ в различни концентрации (Таблица 1).

Таблица 1. Състав на хранителните среди за покълване на семена от *A. montana*

Хранителна среда	Гиберелинова киселина, mg/l	Казеинов хидролизат, mg/l	Агар, g/l	Захароза, g/l
MSK0			6	20
MSK1	30	250	4	20
MSK2	60	250	4	20
MSK3	5		6	20
MSK4	10		6	20
MSK5	20		6	20
MSK6	30		6	20
MSK7	40		6	20
MSK8	50		6	20
MSK9	60		6	20

В две от средите е добавен 250 mg/l хидролизат на казеина. Във всички проучвани хранителни среди количеството на захарозата (2%) е постоянно, докато съдържанието на агара варира (0.4 или 0.6%). Семената са залагани в Петриев бляда с диаметър 9 cm. За установяване на оптималната хранителна среда за покълване е отчетен процент покълнали семена на 21-я ден от залагането им. Получените *in vitro* семеначета са култивирани на различни хранителни среди за по-нататъшно мултиплициране.

II.2. Състав на хранителните среди за микроразмножаване

Проучени са 12 варианта MS хранителни среди, съдържащи 3% захароза, 0.6% агар и различни по вид цитокинини: БАП, зеатин, ТДЗ и 2-иП в концентрации: 0.5, 1 и 2 mg/l. За оптимизиране на процеса на размножаване са изпитани различни комбинации от цитокинините БАП, зеатин и 2-иП в концентрации 0.5 и 1 mg/l и ауксините НОК и ИОК в концентрация 0.1 mg/l (Таблица 5). Залагани са по 40 растения за всяка хранителна среда. Експериментите са осъществени трикратно. За установяване на оптималната хранителна среда за мултиплициране на растенията са отчетени следните параметри: процент индуцирани вегетативни прорастъци, среден брой прорастъци от един експлант и средна височина на прорастъците след 28 дни култивиране.

II.3. Състав на хранителните среди за вкореняване

За индуциране на корени, новоформираните *in vitro* прорастъци с височина 1.5 – 2.0 cm са прехвърляни на хранителни среди за вкореняване. Проучени са единадесет варианта MS хранителни среди, като само една от тях съдържа пълен състав на макро- и микро-

солите и 3% захароза. Останалите съдържат намалени наполовина MS минерални соли, 2% захароза и един от следните ауксини: ИМК, НОК и ИОК в концентрации 0.5, 1 или 2 mg/l. Среда без ауксин служи за контрола. На всяка среда са залагани по 40 растения. Отчетени са следните параметри: процент вкоренени растения, среден брой корени за едно растение и дължина на корените след 28 дни на култивиране. Опитите през различните етапи на *in vitro* размножаване са проведени при следните условия: температура 22 ± 2 °C, фотопериод 16 часа ден/8 часа нощ, $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ интензивност на светлината, осигурена от бели луминисцентни лампи 36 W (Phillips).

II.4. Адаптиране на растенията при *ex vitro* условия

Вкоренените растения от трите произхода *A. montana* са изваждани внимателно от култивационните съдове и измивани на течаща вода за отстраняване на агара, полепнал по корените. След това растенията са засаждани в пластмасови саксийки (6 cm диаметър), съдържащи три различни торфени смеси: M1 – торф: кокосов субстрат (2:1 v/v); M2 – торф: перлит (2:1 v/v) и M3 – торф: перлит: кокосов субстрат (2:1:1 v/v/v). През първата и втората седмица от адаптирането, растенията са покрити с прозрачен полиетилен за осигуряване на висока влажност и достатъчно светлина. Процентът на преживелите растения е определен след четири седмици. Растенията са отглеждани във фитостатно помещение при температура 24 ± 1 °C и относителна влажност на въздуха 70%. Адаптираните растения са засадени при оранжерийни условия след шест седмици.

II.5. Прилагане на различни *in vitro* техники за микроразмножаване

Проучени са три различни техники за *in vitro* размножаване на растенията: 1) на твърда хранителна среда (0.6% агар), 2) в статична течна култура с помощта на мостчета от филтърна хартия и 3) в система за временно потапяне в течна среда (Temporary Immersion System TIS RITA®). В първите два случая са използвани стъклени епруветки (25x140 mm) с 8 ml хранителна среда. Експлантите са поставени вертикално по един в епруетка в агаровата среда или са прикрепени в течната среда чрез мостчета, направени от филтърна хартия. При системата за временно потапяне са използвани култивационни съдове с 200 ml хранителна среда, в които са заложили по 10 експланта. Всеки съд е свързан със захранване с въздух от 0.25 vvm. Потапянето на експлантите е осъществявано четири пъти на ден по пет минути. След четири седмици култивиране е отчетена честотата на формираните прорастъци, средният брой прорастъци, индуцирани от експлант и средната им височина.

III. Продължително *in vitro* съхраняване на отбрани ценни клонове

Забавянето на растежа на клонираните растения е осъществено чрез: намаляване наполовина на минералния състав на хранителната среда; намаляване концентрацията на захарозата (2%); включване на манитол или сорбитол в концентрации 1, 2, 3 или 4%; култивиране при светлина с ниска интензивност ($20 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Отчитани са следните параметри: процент на оцелелите растения, дължина на вегетативната част на растенията и на техните корени по време на съхраняването (на 1, 3 и 6 месец). Възстановяването на растенията след продължително поддържане на среда с манитол или сорбитол е предприето чрез култивиране при оптимални условия за растеж и развитие. Субкултивирането на оцелелите растения е реализирано на хранителна среда с пълен състав на минералните соли за микроразмножаване (MS, съдържаща 1 mg/l БАП и 0.1 mg/l ИОК), последвано от хранителна среда с намален наполовина състав на солите за ризогенезис ($\frac{1}{2}$ MS, допълнена с 0.5 mg/l ИМК) при нормални условия на култивиране (температура 22 ± 2 °C, фотопериод 16/8 h при $40 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ интензивност на светлината).

IV. Получаване на недиференцирани тъкани (калусни култури)

IV.1. Калусогенезис от котиледони и хипокотили

Състав на хранителните среди за инициране на калуси

За инициране на калус е използвана хранителна среда MS с витамини, съдържаща 3% захароза, 0.6% агар и растежни регулатори в различни концентрации (Таблица 2). На всяка хранителна среда са залагани по 30 експланта. Процентът на индуцирания калус е определен след 6 седмици на култивиране. Калусите са субкултивирани на свежа хранителна среда на всеки 21 дни за бъдещ растеж и развитие. Некротиралите тъкани са отстранявани по време на всяко субкултивиране. За определяне на оптималната хранителна среда за формиране на калуса са отчетени следните параметри: интензивност на растеж, консистенция, цвят и структура на калусната тъкан. Експериментите са проведени в две повторения. Калусните култури са отглеждани при следните условия: температура 22 ± 2 °C, фотопериод 16/8 h при $20 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ интензивност на светлината.

Таблица 2. Състав на хранителните среди за индуциране на калусни култури при *A. montana*

Хранителна среда	Растежен регулатор, mg/l				
	БАП	кинетин	2,4-Д	НОК	ИОК
MS1			0.1		
MS2			0.25		
MS3			0.5		
MS4			0.75		
MS5			1.0		
MS6	0.5			1.0	
MS7	0.5		1.0		
MS8	0.5				1.0
MS9	1.0			1.0	
MS10	1.0		1.0		
MS11	1.0				1.0
MS12					0.2
MS13			0.1		0.2
MS14		1.0			0.2
MS15		1.0	0.1		
MS16		1.0	0.1		0.2
MS17		2.0	0.1		0.2

V. Индиректен органогенезис и растителна регенерация

V.1. Състав на хранителните среди за индиректен органогенезис

Последователността на етапите, съставът на хранителните среди и условията на култивиране на разработената система за индиректен органогенезис при *A. montana* са представени на Таблица 3.

Таблица 3. Протокол за индиректен органогенезис при *A. montana*

Етап	Среда	Условия на култивиране
1. Индуциране на калус от листни експланти	MS среда с 0.1 mg/l 2,4-Д	40 дни при 22±2 °C, интензивност на светлината 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
2. Субкултивиране на калуса	MS среда с 0.5 mg/l БАП + 0.1 mg/l 2,4-Д	30 дни при 22±2 °C, интензивност на светлината 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. Регенериране на пъпки	MS среда с 1 mg/l БАП + 0.1 mg/l 2,4-Д (два пасаж)	30 дни при 22±2 °C, интензивност на светлината 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
4. Микроразмножаване на регенерантите	MS среда с 1 mg/l БАП + 0.1 mg/l ИОК	28 дни при 22±2 °C, интензивност на светлината 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
5. Вкореняване на регенерантите	½ MS среда с 0.5 mg/l ИМК	28 дни при 22±2 °C, интензивност на светлината 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
6. Адаптиране при <i>ex vitro</i> условия	Смес от торф: перлит: кокос (2:1:1)	28 дни при 24±1 °C, интензивност на светлината 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Легенда: Културите са поддържани при фотопериод 16 h светлина/8 h тъмнина

VI. Инициране на нетипични корени (hairy roots) при *A. montana* чрез трансформация с *A. rhizogenes*

VI.1. Изходен растителен материал

Като източник на растителни експланти за генетична трансформация са използвани сегменти от добре развити листа на *in vitro* микроразмножени растения в активен растеж (30 дневна култура), както и от растения - регенеранти, получени чрез индиректен органогенезис.

VI.2. Бактериален щам

За генетична трансформация е използван високовирулентният, немодифициран щам на *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, предоставен ни от VTT, Изследователски център на технологиите, Финландия.

VI.3. Условия за култивиране на бактериите

Бактерията е поддържана на агарова среда YEB (Vervliet et al. 1975). Бактериалната култура за инокулиране на растителната тъкан е отглеждана при температура 28 °C, както на твърда хранителна среда за 48 h така и в течна за 24 h. Бактериалната суспензия е получена след въвеждане на единични колонии в колба от 100 ml, съдържаща 8 ml течна среда YEB и е инкубирана на клатачка при 220 rpm. Плътността на суспензията е определяна на SPEKOL при 600 nm (OD_{600}). Изследвано е влиянието на девет различни бактериални концентрации ($\text{OD}_{600} = 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5$) върху ефективността на индуциране на hairy roots.

VI.4. Инокулиране и ко-култивиране на растителни експланти с *Agrobacterium rhizogenes*

Заразяването на растителния материал е осъществено по два начина: чрез нанасяне върху наранени със скалпел листни експланти на бактериална култура, отгледана върху агарова среда и по метода на листните дискове (Horsch et al. 1985), чрез инфектиране на наранени в областта на листната жилка експланти с 24 часова бактериална суспензия за 5, 15, 20 или 40 min. Ко-култивирането, което е с продължителност от 2 до 12 дни до поява на пелена от бактерия е осъществено на среда MS без растежен регулатор при температура 25 °C, на тъмно през първите 2 дни, а след това при интензивност на светлината 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Неинфектираните експланти, използвани като контрола са култивирани при същите условия. След трикратно промиване със стерилна дестилирана вода и попиване на

стерилна филтърна хартия, експлантите са култивирани на основна хранителна среда MS, съдържаща 200, 300 или 400 mg/l цефотаксим за отстраняване на бактерията. За оптимизиране на условията за генен пренос е проучено влиянието на следните фактори: плътност на бактериалната култура, продължителност на инокулирането и ко-култивирането. Честотата на трансформация (изразена чрез процента на заразените експлантите, продуциращи корени) е отчетена след 6 седмици. Данните, използвани за нейното определяне са събрани от три различни експеримента и са представени като средни стойности. Формираните hairy roots са пренасяни на безхормонална MS хранителна среда с намаляващи концентрации на цефотаксима до окончателното отстраняване на бактерията.

VI.5. Растеж и развитие на нетипичните корени

След елиминиране на бактерията, индуцираните нетипични корени са култивирани на различни по състав основни хранителни среди - MS, B5 (Gamborg et al. 1968) и SH (Schenk and Hildebrandt 1972), съдържащи захароза (3%) и агар (0.6%) за определяне на оптималната за растежа и развитието им. Нетрансформирани корени (НТ), изрязани от *in vitro* поддържани растения са използвани като контрола при изследване растежа на четири трансгенни клона (ТМ1, ТМ2, ТР3 и ТР4). Клоновете ТМ1 и ТМ2 произхождат от микроразмножени растения, докато ТР3 и ТР4 от растения регенерирани от калус. Трансгенен клон (ТР4), показал най-добра растежна характеристика е използван за проучване влиянието на различни въглехидратни източници (захароза, малтоза и глюкоза) в концентрации 1, 3, 5, 7 и 9% върху натрупването на биомаса и на БАВ.

VI.6. Доказване на трансгенната природа на формираните нетипични корени
Получените корени са анализирани чрез PCR реакция със специфични праймери от кодиращата секвенция на *rolA*, *rolB* и *rolC* гените.

VII. Фитохимични анализи на получените *in vitro* култури

VII.1. Определяне на количеството на сескитерпенови лактони

За количествено определяне на сескитерпенови лактони в листа и цветове от *in vitro* растения са използвани ¹H ЯМР спектроскопия и газова хроматография. Извличането на тоталния екстракт и пречистването му до получаване на обогатена на лактони фракция е осъществено по методиката на Malarz et al. (1993). Използваните техники позволяват определяне общото съдържание на лактони, количеството на двата типа лактони – хеленалинови и 11α,13-дихидрохеленалинови естери, както и съдържанието на основните индивидуални компоненти - Н-Ас (хеленалин ацетат); dН-Ас (11α,13-дихидрохеленалин ацетат); Н-іВu (хеленалин изобутират); dН-іВu (11α,13-дихидрохеленалин изобутират); Н-Met (хеленалин метакрилат); dН-Met (11α,13-дихидрохеленалин метакрилат), Н-2MeВu (хеленалин 2-метилбутират); dН-2MeВu (11α,13-дихидрохеленалин 2-метилбутират); Н-іVal (хеленалин изовалерат); dН-іVal (11α,13-дихидрохеленалин изовалерат); Н-Tig (хеленалин тиглат); dН-Tig (11α,13-дихидрохеленалин тиглат).

VII.2 Газово хроматографски/масспектрометричен анализ (ГХ/МС) на hairy roots.

За ГХ/МС анализ са използвани hairy roots от *A. montana*, култивирани на хранителна среда MS, съдържаща захароза, малтоза или глюкоза в концентрации 1, 3, 5, 7 и 9%. Компонентите в пробите са идентифицирани чрез сравнение на техните масспектри с масспектри от базата данни на NIST 08 (NIST Mass Spectral Database, PC-Version65.0, 2008) – Национален Институт по стандартизация и технологии, Гайтерсбург, САЩ) и специфичната база данни – The Golm Metabolome Database (Kopka et al. 2005). Количеството на компонентите е представено като процент от общия йонен ток.

VIII. Статистически анализ

Данните са статистически анализирани и са представени като средна стойност и стандартна грешка. Осъществен е one-way ANOVA анализ на вариантите за сравняване на средните стойности и значимите разлики изчислени в съответствие с Fisher LSD тест, използвайки статистически софтуерен пакет (Statgraphics Plus, version 5.1 за Windows). С различните букви са означени достоверните разлики ($P \leq 0.05$), оценени след провеждането на ANOVA анализа.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. *In vitro* микроразмножаване

I.1. Обеззаразяване на изходния растителен материал

Повърхностната стерилизация на изходния растителен материал е най-важната стъпка преди въвеждането на експланти в условия *in vitro*. Прилагането на 70% етилов алкохол самостоятелно за 5 min води до обеззаразяване на около половината от семената, което показва, че последният не е достатъчно ефективен. От приложените схеми за обеззаразяване на семената успешна стерилизация (100% асептични семеначета) е постигната при използване на комбинацията от последователни потапяния в 70% C_2H_5OH за 1 min и търговска белина ACE без разреждане за 10 min, която е най-подходяща и при трите проучвани произхода. Втора по ефективност е комбинацията от 70% C_2H_5OH за 2 min и 0.1% $HgCl_2$ за 3 min, при която са отчетени 82.6 – 95% стерилни експланти.

I.2. Покълване на семена в условия *in vitro*

Третирането на семената от *A. montana* с разтвор на 0.03% гиберелинова киселина (GA_3) за 24 часа е ефективен начин за нарушаване на тяхното латентно състояние. След тази обработка е наблюдавано стимулиране кълняемостта на семената при култивирането им на изпитваните хранителни среди, които съдържат различни концентрации на GA_3 . Хранителни среди, съдържащи 250 mg/l хидролизат на казеина, намалено количество агар (4 g/l) и 30 или 60 mg/l GA_3 показват съответно 43.3 и 46.7% кълняемост на семената (данните не са представени в таблицата). Казеиновият хидролизат и по-ниската концентрация на агара не оказват влияние върху кълняемостта на семената. Най-висок процент покълнали семена (произход Германия) е отчетен на MS среда, съдържаща 50 mg/l GA_3 . Семената на тази среда започват да покълват на 6-8 ден, като кълняемостта им достига 72% на 21-я ден (Таблица 4, Фиг. 1).

Таблица 4. Влияние на различните концентрации гиберелинова киселина в хранителната среда върху кълняемостта на семена от *A. montana*

Хранителна среда + GA_3 , mg/l	Произход Германия		Произход Украйна	
	Брой култивирани семена	Покълнали семена, %	Брой култивирани семена	Покълнали семена, %
MSK0	30	43.3	22	40.9
MS + 5 GA_3	30	33.3	56	46.4
MS + 10 GA_3	30	40.0	58	48.3
MS + 20 GA_3	30	46.7	67	49.2
MS + 30 GA_3	30	53.3	52	51.9
MS + 40 GA_3	30	46.7	73	61.6
MS + 50 GA_3	50	72.0	60	41.7
MS + 60 GA_3	30	56.7	54	38.9

На хранителни среди с по-ниско съдържание на GA_3 е наблюдавано по-слабо покълване, а при завишаването на GA_3 над 50 mg/l кълняемостта започва отново да намалява. Подобна тенденция е наблюдавана и при семената от произход Украйна, с тази разлика, че подходящата концентрация на GA_3 е 40 mg/l, при която е отчетен най-висок процент кълняемост (61.6%). Над това ниво кълняемостта отново започва да намалява, което означава, че е прехвърлена оптималната концентрация на GA_3 .



Фиг. 1. Покълнали семена от *A. montana* (произход Германия) на хранителна среда MS, съдържаща 50 mg/l GA_3

I.3. *In vitro* мултиплициране на растенията

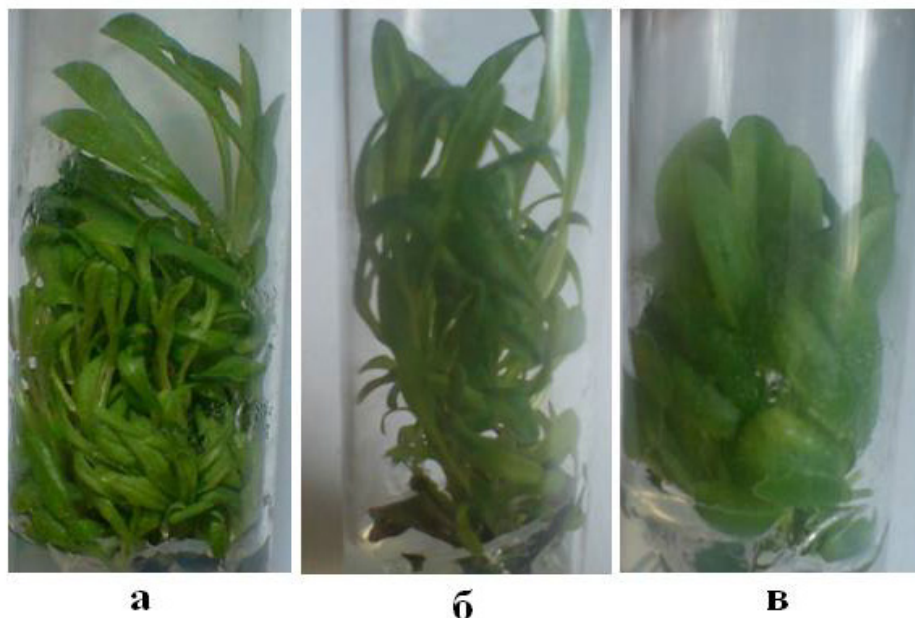
I.3.1. Проучване самостоятелното участие на цитокинините в средата при микроразмножаването

Експлантите култивирани на контролната хранителна среда (MS без растежни регулатори) не формират странични вегетативни прорастъци в изпитания период на култивиране, въпреки че нарастват на височина и част от тях образуват корени в основата си (30%). Честотата на индуцираните прорастъци и техният брой е повлиян значително от вида и концентрацията на използваните цитокинини. Максимална степен на мултиплициране (92.5%) е постигната на MS среда, съдържаща 1 mg/l БАП, където са формирани средно 3.12 прорастъка за експлант. По-нататъшното увеличаване на БАП (2 mg/l) доведе до намаляване на процента на формираните адвентивни прорастъци и на техния брой от един експлант. Цитокининът зеатин в концентрация 1 mg/l също се оказва подходящ за микроразмножаване на *A. montana*. Процентът на индуцираните прорастъци е 70% със среден брой 2.35 и височина от 2.25 cm, като е отчетен едновременно и 40% ризогенезис. Проучваните концентрации на 2-иП, включени към MS среда, не са ефективни за индуциране на вегетативни пъпки, а и в повечето случаи е наблюдавано формиране на корени. Присъствието на 2-иП или зеатин в средата стимулира нарастването на прорастъците на височина. Всички тествани концентрации на ТДЗ предизвикват образуване на зелен, силно нараснал калус в основата на растенията. Върху неговата повърхност са наблюдавани много на брой, малки по размер пъпки. При пренасянето на калуса, заедно с новоформираните дребни пъпки на MS среда, която не съдържа растежни регулатори, те се оформят в добре развити растения. При субкултивирането на микроклонираните растения на среда, съдържаща оптималната концентрация от 1 mg/l БАП, степента на размножаване

и средният брой растения от експлант значително нараства, достигайки 5.4 при второто субкултивиране.

1.3.2. Влияние на различните комбинации от растежни регулатори върху микроразмножаването

Проследено и оценено е влиянието на комбинациите от цитокинини и ауксини върху процеса на формиране и развитие на прорастъци при *A. montana*. Експлантите са култивирани на среди, съдържащи БАП, зеатин или 2-иП в концентрации 0.5 и 1 mg/l в комбинации с ауксините НОК или ИОК в концентрация 0.1 mg/l. Култивираните сегменти продуцират вегетативни прорастъци с различна честота в зависимост от вида и концентрацията на приложените растежни регулатори (Таблица 5, Фиг. 2). Процентът на експлантите, показващи индуциране на вегетативни прорастъци и броят им за един експлант се увеличава постепенно с нарастване концентрацията на цитокинина от 0.5 на 1.0 mg/l и при неговото комбиниране с една и съща ниска концентрация на ауксин. При култивиране на експлантите на среда със зеатин (1 mg/l) в комбинация с НОК или ИОК честотата на мултиплициране е съответно 72.5% и 87.5%. Голям брой прорастъци за експлант (3.52) и средна височина (2.78 cm) са отчетени на хранителна среда, съдържаща 1 mg/l зеатин/ 0.1 mg/l ИОК. Най-ефективна хранителна среда за микроразмножаване на *A. montana* е MS, съдържаща 1.0 mg/l БАП и 0.1 mg/l ИОК, където са получени най-голям среден брой прорастъци от изходен експлант (4.25) със средна височина (2.25 cm). Всички други тествани комбинации са по-малко ефективни за мултиплициране на вида. За ефективността на БАП при индуцирането на прорастъци от *A. montana* съобщават и други автори (Conchou et al. 1992; Lê 1998, 2000; Weremczuk-Jeżyna and Wysokińska 2000; Stefanache et al. 2010; Surmacz-Magdziak and Sugier 2012).

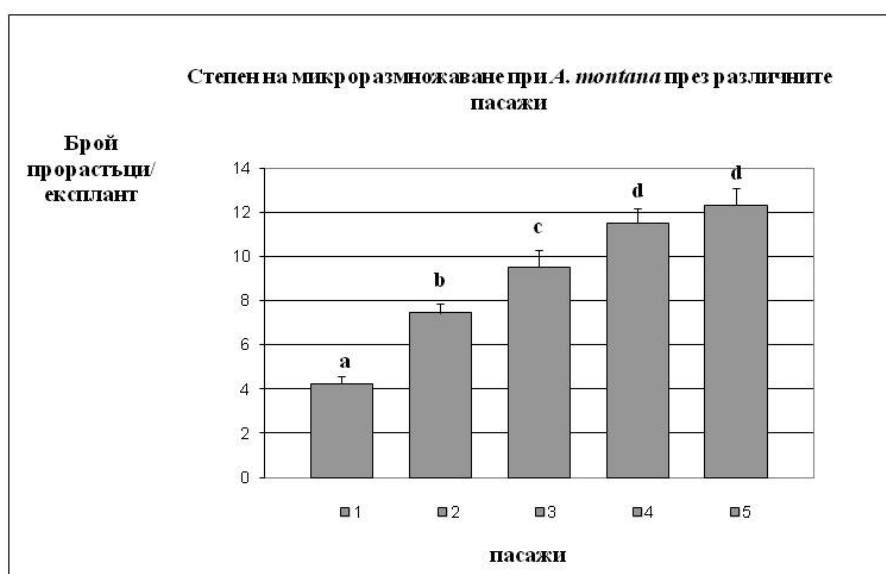


Фиг 2. Микроразмножаване на *A. montana* на MS хранителна среда, съдържаща а) 1 mg/l БАП и 0.1 mg/l ИОК, б) 1 mg/l зеатин и 0.1 mg/l ИОК и в) 1 mg/l 2-иП и 0.1 mg/l ИОК

Таблица 5. Влияние на различните комбинации от растежни регулатори върху микроразмножаването на *A. montana*

Растежни регулатори, mg/l	Формирани прорастъци, %	Брой прорастъци/експлант	Височина на прорастъци, cm	Вкореняване, %
БАП + НОК				
0.5 + 0.1	62.5	2.72 ± 0.29 ^a	2.84 ± 0.12 ^b	0
1.0 + 0.1	75	3.82 ± 0.33 ^{bc}	2.32 ± 0.10 ^a	0
БАП + ИОК				
0.5 + 0.1	77.5	2.97 ± 0.28 ^{ab}	2.63 ± 0.11 ^b	0
1.0 + 0.1	95	4.25 ± 0.35 ^c	2.25 ± 0.05 ^a	0
зеатин + НОК				
0.5 + 0.1	45	1.45 ± 0.11 ^a	2.91 ± 0.08 ^a	8
1.0 + 0.1	72.5	2.82 ± 0.25 ^b	3.23 ± 0.14 ^b	10
зеатин + ИОК				
0.5 + 0.1	82.5	3.07 ± 0.26 ^{bc}	2.94 ± 0.10 ^a	0
1.0 + 0.1	87.5	3.52 ± 0.29 ^c	2.78 ± 0.07 ^a	
2-иП + НОК				
0.5 + 0.1	5	1.05 ± 0.03 ^a	3.12 ± 0.15 ^b	45
1.0 + 0.1	12.5	1.12 ± 0.05 ^{ab}	2.74 ± 0.11 ^a	50
2-иП + ИОК				
0.5 + 0.1	7.5	1.07 ± 0.04 ^{ab}	3.03 ± 0.14 ^{ab}	50
1.0 + 0.1	17.5	1.20 ± 0.07 ^b	2.85 ± 0.10 ^{ab}	55

Многократното субкултивиране е един от начините за получаване на нови растения. Получените *in vitro* култури могат да се поддържат и размножават дълго време, без да загубят морфогенетичния си потенциал. Новополучените растения от *A. montana* са субкултивирани петкратно на оптималната хранителна среда за предизвикване на голям брой вегетативни прорастъци (Фиг. 3).

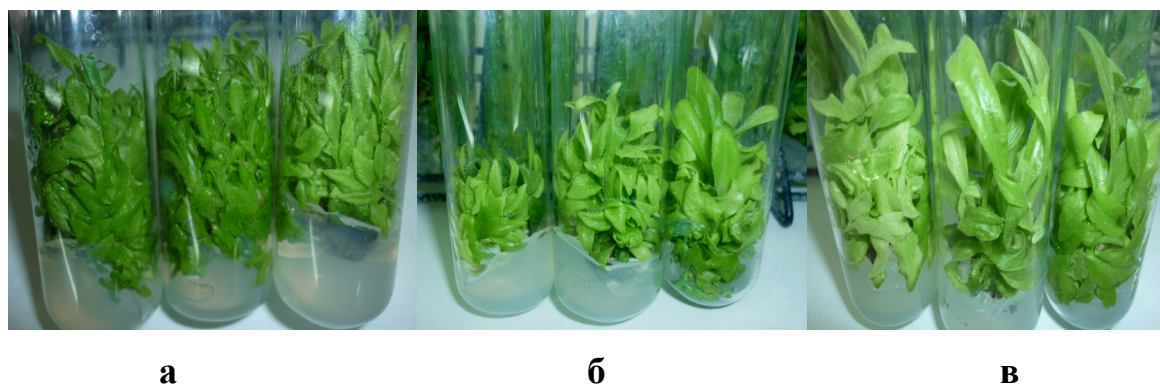


Фиг. 3. Влияние на комбинацията БАП/ИОК върху броя на формираните прорастъци по време на пет субкултивирания

При култивиране на експлантите във втори пасаж се наблюдава увеличаване на средния брой прорастъци от експлант (средно 7.46) на среда MS, съдържаща 1 mg/l БАП и 0.1 mg/l ИОК, като при някои от експлантите са отчетени до 16 броя прорастъци. При останалите тествани хранителни среди този показател не се променя съществено. С увеличаване на пасажите степента на микроразмножаване расте, като в пети пасаж средният брой прорастъци от един експлант достига до 12.32. Данните показват, че честотата на мултиплициране не затихва за проучвания период и дори се запазва в следващите пасажии на култивиране. По този начин са получени голям брой микроразмножени растения.

I.3.3. Роля на произхода при микроразмножаването

Проучено е влиянието на три произхода *A. montana*: Германия, Украйна и Австрия върху степента на мултиплициране на растенията. Всички отчетени параметри, характерни за микроразмножаването варират при растенията от трите произхода, култивирани на една и съща хранителна среда (Фиг. 4). При комбинацията БАП/ИОК, броят на формираните прорастъци е по-висок за произходи Германия и Украйна и по-нисък за произход Австрия. Влиянието на комбинацията Зеатин/ИОК върху мултиплицирането е най-силно изразено за растенията от произход Германия, а най-слабо за растенията от произход Австрия. Получените данни показват, че освен вида на растежния регулатор, неговата концентрация и комбинация, произходът е от важно значение за степента на микроразмножаването на *A. montana*.



Фиг. 4. Микроразмножени растения от три произхода *A. montana*: а) Германия; б) Украйна и в) Австрия на хранителна среда MS, съдържаща 1mg/l БАП и 0.1 mg/l ИОК

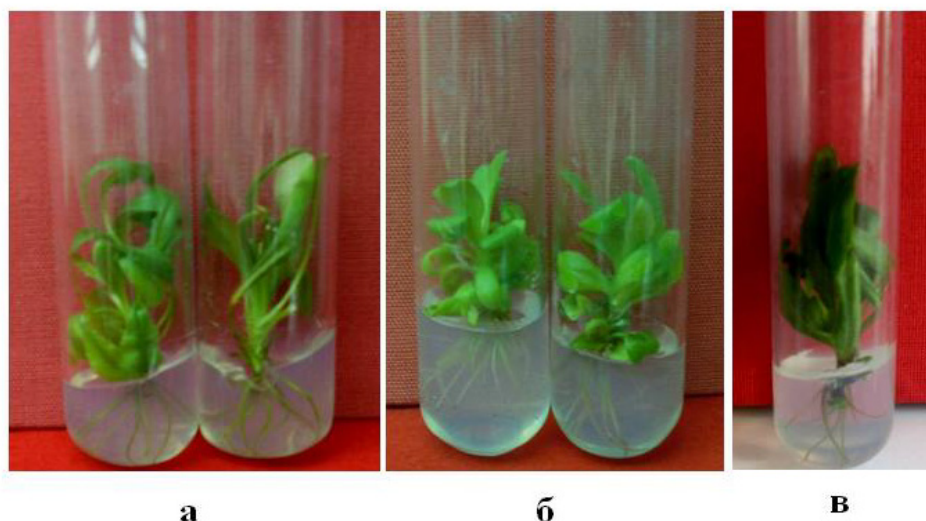
I.4. In vitro вкореняване на растенията

Вкореняването на растенията започва след 7-12 дни от култивирането им на хранителни среди, съдържащи различни по вид и концентрация ауксини за индуциране на ризогенезис. По-висок процент коренообразуване (50%) е отчетен на хранителна среда MS, съдържаща намалено наполовина количество соли и захароза (2%), в сравнение със средата с пълен състав на солите и захарозата (3%), където са формирани 30% корени. Образуването на корени на $\frac{1}{2}$ MS среда без ауксини е слабо като е отчетен най-малък среден брой корени (1.22) в сравнение с всички тествани среди. Ауксините ИМК, НОК и ИОК в приложените концентрации към $\frac{1}{2}$ MS среда оказват положително влияние върху индуцирането на корени (Таблица 6). От трите ауксина, ИМК е по-ефективният за предизвикване на нови корени от НОК или ИОК. Максимално вкореняване (100%) е наблюдавано на $\frac{1}{2}$ MS среда, съдържаща ИМК във всички проучвани концентрации. Най-голям брой корени от едно растение (5.0) са получени на

среда $\frac{1}{2}$ MS с 0.5 mg/l ИМК (Фиг. 5). Средният брой корени намалява с увеличаване концентрацията на ИМК. Дължината на корените не се различава значително при различните концентрации ИМК и варира от 1.51 до 1.82 cm. Корените са нормални на външен вид, неразклонени и зеленикави на цвят. Те са здраво прикрепени към основата на растенията, което гарантира успешното им *ex vitro* адаптиране.

Таблица 6. Влияние на различните по вид и концентрация ауксини, добавени към $\frac{1}{2}$ MS среда върху ризогенезиса на *A. montana*

Вид ауксин	Концентрация на ауксина, mg/l	Вкоренени растения, %	Брой корени/ растение	Дължина на корена, cm
Контрола	0	50	1.22±0.06 ^a	1.34±0.12 ^a
ИМК	0.5	100	5.00±0.16 ^c	1.51±0.11 ^{ab}
	1	100	3.75±0.38 ^b	1.82±0.14 ^b
	2	100	3.50±0.35 ^b	1.73±0.12 ^b
НОК	0.5	100	4.12±0.28 ^b	1.84±0.15 ^a
	1	90	3.80±0.27 ^b	2.04±0.22 ^{ab}
	2	90	2.27±0.24 ^a	2.41±0.31 ^b
ИОК	0.5	85	2.52±0.19 ^b	1.02±0.13 ^a
	1	80	2.15±0.17 ^{ab}	1.33±0.15 ^a
	2	70	1.92±0.16 ^a	1.82±0.21 ^b



Фиг. 5. Влияние на различните ауксини върху ризогенезиса на *A. montana*: а) Вкоренени растения на $\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/l НОК, б) Вкоренени растения на $\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/l ИМК, в) Вкоренени растения на $\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/l ИОК

Висок процент вкореняване (100%) е отчетен при култивиране на растенията върху $\frac{1}{2}$ MS среда, допълнена с 0.5 mg/l НОК със среден брой корени от едно растение

4.12 и средна дължина на корена 1.84 см. Увеличаването на съдържанието на този ауксин води до постепенно намаляване броя на корените и нарастване на тяхната дължина. От тестваните концентрации на ИОК, най-висока степен на вкореняване (85%) е отчетена на $\frac{1}{2}$ MS с 0.5 mg/l ИОК, където са формирани най-голям брой корени от едно растение (2.52). При по-високите концентрации (1 и 2 mg/l) на ИОК, корените са тънки и лесно се отделят от основата на растенията при изваждането им от култивационните съдове, което е пречка за по-нататъшното *ex vitro* адаптиране на растенията.

1.5. Адаптиране на растенията в *ex vitro* и планински условия

Адаптирането на получените *in vitro* растения при външни условия е един от най-критичните етапи при микроразмножаването. Изпитани са различни добре аерирани субстрати, състоящи се от торф, перлит и кокосов субстрат. Установено е, че използваните смеси имат положително влияние върху степента на оцеляване и растежа на растенията. Най-висок процент преживяемост на растенията (90%) е отчетен след прехвърлянето им на смес от торф, перлит и кокосов субстрат (2:1:1 v/v/v), където растенията са с добре развита листна маса. Процентът на успешно адаптирани растения е повлиян и от размера на растението и дължината на корена му. По време на *in vitro* вкореняването височината на растенията варира между 1 и 2.5 cm, а дължината на корена между 0.5 и 2.0 cm. Най-подходящи за адаптиране в условия *ex vitro* се оказват растенията с височина 1.5-2.0 cm и дължина на корена 1.0-1.5 cm, при които е отчетена 85% преживяемост. Значително по-ниска е преживяемостта на растенията с височина 2.0-2.5 cm и дължина на корена 1.5-2.0 cm (46.1%). Адаптираните *in vitro* размножени растения са засадени в опитното поле на ИБЕИ, БАН, което се намира в областта Беглика, Родопите на 1500 m надморска височина и се отличава със средна годишна температура 3.8 °C, годишно количество на валежите 1002 mm и влажност на въздуха 81.7%. В края на вегетационния сезон (месец октомври) всички растения (100%) са аклиматизирани към новите условия. Те имат добър растеж и развитие, но не формират цветоносни стъбла. Известно е, че *A. montana* започва да цъфти през втората година от своето развитие (Фиг. 6).



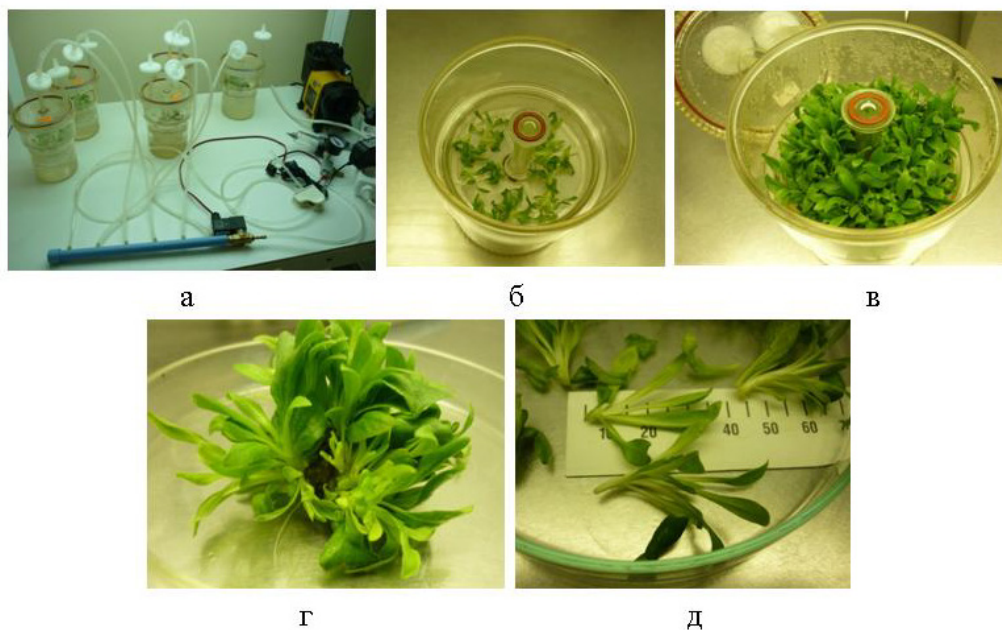
Фиг. 6. Едногодишни (а) и тригодишни растения (б), засадени в местността Беглика, Родопите

През май 2011 г. са отчетени 60% процента преживели тежката зима двегодишни растения. Установено е, че процесът на образуване на дъщерни растения в основата на листната розетка започва още в началния етап от развитието на индивида. През този период се развиват и по-голямата част от вторичните корени. Формираните множество отделни единици в едно растение могат да бъдат разделени, което създава добра възможност за вегетативно размножаване на *A. montana*. Наблюдавано е формиране на

една до четири дъщерни единици при 25-30% от растенията още през първите месеци. При едногодишните растения, 100% от тях образуват до осем дъщерни индивиди. Резултатите показват, че броят на цветоносните стъбла за едно растение варира от 1 до 16, а цветните кошнички – от 1 до 80. Добивът е 31.56 кг/дка за цветните кошнички от двегодишните растения и 63.60 кг/дка за тези от тригодишните растения във фаза на масов цъфтеж. В наличната литература няма данни за аклиматизиране на *in vitro* растения от *A. montana* в планински условия.

I.6. Сравнително изследване на различни *in vitro* системи за култивиране

Култивирането на растенията в системата за временно потапяне в течна среда – минибиореактор TIS RITA[®] (Фиг. 7) доведе до формиране на най-висок среден брой прорастъци от експлант (18.2), най-голямо количество биомаса (изразена чрез сухото тегло) и най-високо съдържание на общи лактони в сравнение с другите две *in vitro* проучвани системи на култивиране. Вторият по ефективност метод за размножаване е при използване на твърда агарова среда. Средният брой прорастъци от експлант достига 7.6, а растенията са с най-малки размери 1.81 cm. Култивирането на течна хранителна среда с помощта на мостчета от филтърна хартия е по-малко ефективно в сравнение с другите два начина на микро размножаване (средният брой прорастъци от експлант е 3.9), като са наблюдавани и случаи на витрификация. Растенията, размножени чрез TIS образуват най-голям среден брой корени (6.4) и се характеризират с висока преживяемост (95%) при адаптирането им в *ex vitro* условия.



Фиг. 7. Микро размножаване на *A. montana* при използване на TIS RITA[®] култура: а) изглед на цялата TIS RITA[®] система, б) култивиране на първоначални експлант, в) получаване на растения след 28 дни култивиране, г) микро размножаване на един експлант, д) измерване височината на прорастъците

II. Продължително съхраняване на растенията в условия *in vitro*

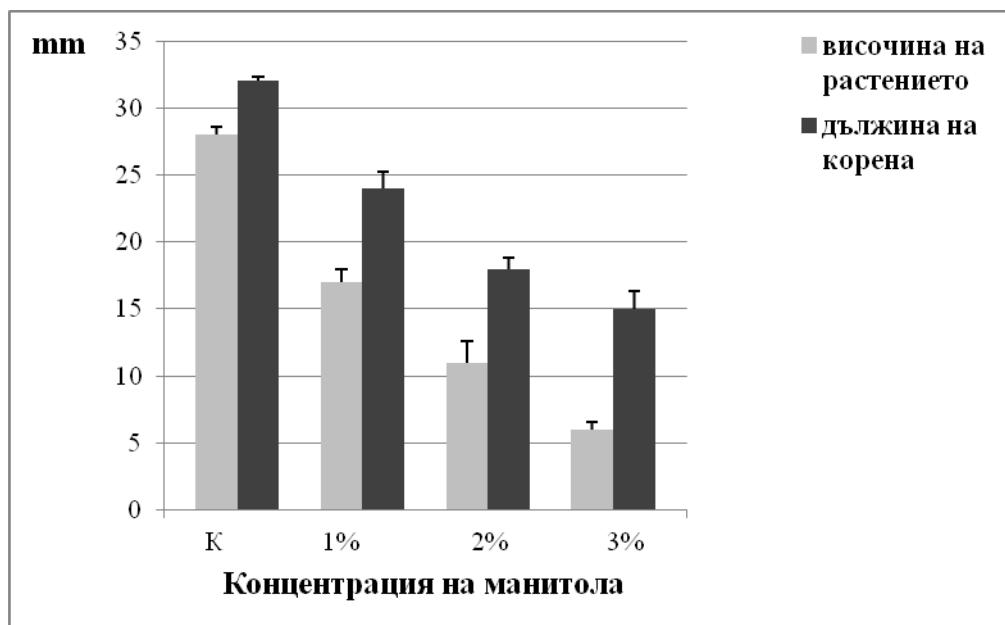
В нашите изследвания бавен растеж на растенията е постигнат чрез поддържане на *in vitro* културите при намалено наполовина съдържание на минералните соли в хранителната среда, добавяне на манитол или сорбитол в концентрации от 1, 2, 3 или 4%, по-ниска концентрация на захарозата (2%) и намалена интензивност на светлината

($20 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Добре оформените *in vitro* растения, след като са прехвърлени на $\frac{1}{2}$ MS0 среда за ризогенезис (контрола), образуват мощна коренова система и процентът на вкоренените растения достига 100% още на първия месец от култивирането. Поради бързото им израстване (2.8 cm), те се нуждаят от прехвърляне на свежа хранителна среда. При добавяне на 1% манитол в средата се развиват жизнеспособни растения като процентът на преживяемост е 90%, след един месец на култивиране (Таблица 7). Присъствието на това количество манитол оказва благоприятно влияние върху индуцирането на два до три добре оформени адвентивни прорастъка в основата на растенията. От друга страна 1% манитол предизвиква намаляване растежа на вегетативната част на растенията (средна височина от 1.7 cm), но не и дължината на корените (2.4 cm), което позволява растенията да бъдат поддържани в продължение на три месеца (Фиг. 8). След този период от време е необходимо тяхното прехвърляне на свежа среда. Присъствието на 2% манитол в средата създава условия на осмотичен стрес, в резултат на който се редуцира растежа на растенията. По този начин се увеличава времето за субкултивиране, но намаляват стойностите на всички изследвани параметри. Преживяемостта на растенията спада на 65% още първия месец и остава такава до края на култивирането. Растежът започва да се забавя, като стъблото се скъсява, листата издребняват и се формират корени, които спомагат за по-дългото култивиране на растенията. Това позволява субкултивирането да се осъществи след шест месеца. Средната дължина на растенията и корените също се редуцират (Фиг. 8).

Таблица 7. Влияние на различните концентрации на манитол върху преживяемостта на растенията от *A. montana* (Произход Германия)

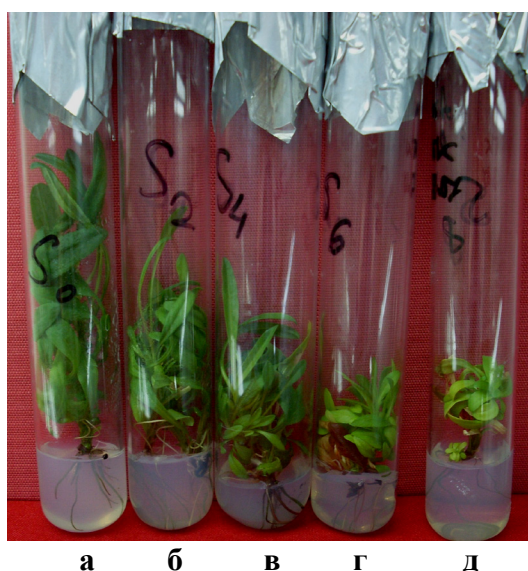
Хранителна среда ($\frac{1}{2}$ MS)	Концентрация, %	Преживяемост (%) след месеци		
		1	3	6
Контрола Манитол	0	100	-	-
	1	90	90	-
	2	65	65	65
	3	55	40	-
	4	20	-	-
Сорбитол	1	95	90	-
	2	85	80	-
	3	80	70	70
	4	30	-	-

Установено е, че комбинация от 2% захароза и 2% манитол в $\frac{1}{2}$ MS среда е оптимална за *in vitro* съхраняване на растенията, поддържани при намалена интензивност на светлината в продължение на шест месеца. При по-нататъшното увеличаване концентрацията на манитола на 3% в средата е наблюдавано пожълтяване на листата и некротиране на вегетационния връх на растенията, които загиват след третия месец. Присъствието на 4% манитол в средата блокира растежа и формирането на корени. Растенията са с изключително забавен растеж и развитие, степента на преживяемост е ниска (20%). Растенията загиват още първия месец след култивирането.



Фиг. 8. Влияние на манитола върху височината на вегетативната част и дължината на корените на растенията от *A. montana* в условия на бавен растеж

Подобна тенденция е наблюдавана и на хранителни среди с осмотичния регулатор сорбитол, с тази разлика, че оптималната концентрация за продължително *in vitro* съхраняване на растителния материал е 3%, където растежът на растенията е забавен, но те остават жизнеспособни (Фиг. 9). Преживяемостта им е 70% след шест месеца на култивиране (Таблица 7). Комбинацията от 2% захароза и 3% сорбитол в средата осигурява оцеляването на растения със здрави вегетационни върхове при намалена интензивност на светлината.



Фиг. 9. Растения от *A. montana*, растящи на среди със сорбитол:
а) Контрола; б) 1%; в) 2%; г) 3%; д) 4%

Осмотичните агенти като сорбитол и манитол създават условия на осмотичен стрес в растенията, които водят до редуциране поемането на водата от растението

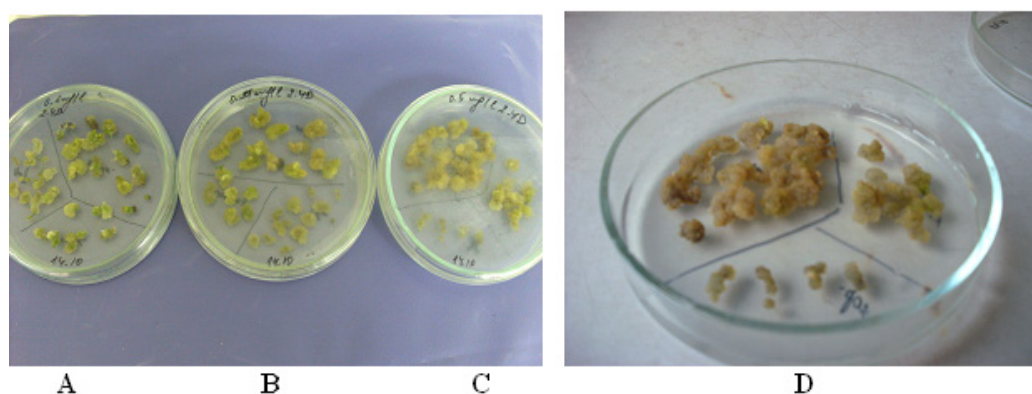
(Shibli et al. 2006; Sharaf et al. 2012), намаляват оптималното налягане на тургора необходимо за клетъчното делене и по този начин инхибират растежа (Moges et al. 2003).

Периодът на съхраняване зависи от вида и обема на култивационните съдове. При всички проучвани среди с манитол или сорбитол, колбите са по-подходящи от епруветките. Културите в епруветките се нуждаят от по-ранно субкултивиране в сравнение с тези от колбите, поради бързото изчерпване на хранителната среда, която е в по-малко количество. При растенията, отглеждани в колби на хранителна среда, съдържаща 3% сорбитол е отчетена 40% преживяемост след период на съхраняване една година. При условията на бавен растеж, културите не проявяват витрификация през периода на съхранение.

Трите произхода, които са от различни местообитания не показват разлики в тяхната преживяемост за период от шест месеца на съхраняване, което предполага генотипна независимост в периода на бавен растеж т.е. успехът на съхраняването не зависи от произхода. Растенията са прехвърляни на среда, която не съдържа растежен и осмотичен регулатор за връщането им към растеж и развитие, което дава възможност за нарастване на растенията при стандартни условия след продължителния период на съхранение. Растежът на растенията е възстановен при температура от 22 ± 2 °C и интензитет на светлината от $40 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ след шест месеца на съхраняване. Впоследствие растенията са микроразмножени на MS среда, съдържаща 1.0 mg/l БАП или в комбинация с 0.1 mg/l ИОК след три и след шест месеца на съхраняване. Мултиплицирането е затруднено за растенията, които са поддържани в условия на бавен растеж в продължение на шест месеца. Необходими са един - два пасажа на субкултивиране за израстване на растенията, преди да започне процесът на микроразмножаване.

III. Получаване на недиференцирани тъкани (калусни култури)

Честотата на калусообразуване зависи от вида на експланта и състава на хранителната среда. Котиледоните и хипокотилите, взети от 15 дневни семеначета, формират първичен калус след шест седмици на култивиране върху повечето от тестваните хранителни среди. Първоначално е проучено влиянието на ауксина 2,4-Д върху калусогенезиса при *A. montana* (Фиг. 10).



Фиг. 10. Индуциране на калус на различни хранителни среди, съдържащи 2,4-Д. А) MS1 (MS+ 0.1 mg/l 2,4-Д); В) MS2 (MS+0.25 mg/l 2,4-Д); С) MS3 (MS+0.5 mg/l 2,4-Д); D) MS5 (MS+1.0 mg/l 2,4-Д).

Самостоятелното участие на 2,4-Д във всички изпитани концентрации в хранителни среди от MS1 до MS5 предизвиква формиране на калуси по отрезите и на двата вида експлант (100%). При по-ниските нива на 2,4 Д (0.1 и 0.25 mg/l), калусната тъкан се характеризира с бледозелен цвят и по-добър растеж в сравнение с тази при останалите концентрации (0.5; 0.75 и 1 mg/l). Калусите, на среди с по-високо съдържание на 2,4-Д са с тъмножълт цвят и бавен растеж. Растежът на калусите е инхибиран напълно във втория пасаж на хранителни среди с 2,4-Д в проучените концентрации.

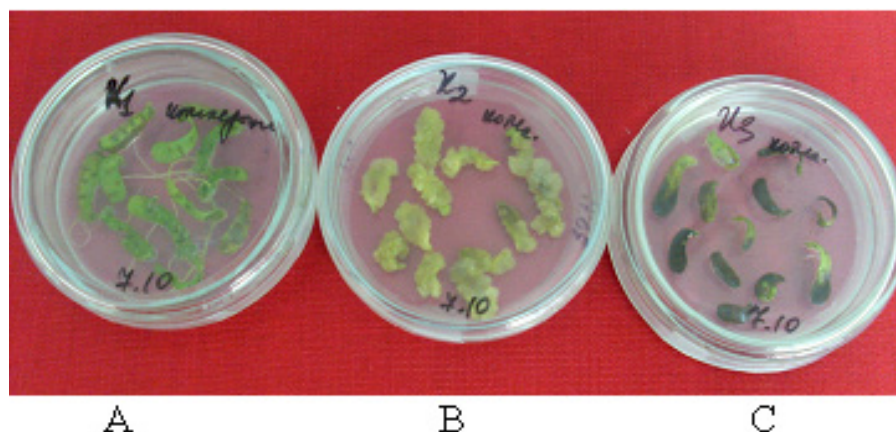
Изследвано е влиянието и на комбинациите от ауксините 2,4-Д, НОК и ИОК и цитокинина БАП върху индуцирането на калуси при *A. montana* (Таблица 8).

Таблица 8. Влияние на различните ауксини в комбинация с БАП върху индуцирането на калуси от експлант на семеначета от *A. montana*

Растежни регулатори, mg/l					Индуцирани калуси, %	Характеристика на калусите		
№ среда	БАП	2,4-Д	НОК	ИОК		Консистенция	Цвят	Интензивност на растежа
КОТИЛЕДОНИ								
MS6	0.5		1		46.7	компактен	зелен	+
MS7	0.5	1			86.7	рехав	светложълт	++
MS8	0.5			1	0	-	-	-
MS9	1		1		53.3	компактен	зелен	+
MS10	1	1			83.3	рехав	светложълт	++
MS11	1			1	0	-	-	-
ХИПОКОТИЛИ								
MS6	0.5		1		73.3	компактен	светлозелен	+
MS7	0.5	1			96.7	рехав	бял	++
MS8	0.5			1	0	-	-	-
MS9	1		1		80.0	компактен	светлозелен	+
MS10	1	1			93.3	рехав	бял	++
MS11	1			1	0	-	-	-

Легенда: (-) няма ефект; (+) ниска интензивност; (++) средна интензивност; (+++) висока интензивност на растежа

За разлика от негативния ефект на високите концентрации на 2,4-Д върху растежа на калусите, то при комбинирането на 1 mg/l от този ауксин с БАП в концентрации 0.5 и 1 mg/l в хранителни среди MS7 и MS10 е наблюдавано, че котиледоните формират бързорастящ, светложълт, рехав калус, а хипокотилите образуват калус с бял цвят и рехав структура. Процентът на индуцираните калуси от котиледони на хранителни среди (MS6 и MS9), съдържащи НОК и БАП е 46.7% и 53.3% съответно, а този от хипокотили – 73.3% и 80% съответно. Калусът се характеризира с бавен растеж, зелен цвят, зърнеста структура и формиране на корени. Установено е, че експлантите от хипокотили показват по-висок отговор към индуциране на калус в сравнение с този на котиледоните. В присъствието на ИОК и БАП в среди (MS8 и MS11) експлантите некротират (Фиг. 11).



Фиг. 11. Индуциране на калус при различни комбинации от растежни регулатори: А) MS6 (MS+0.5 mg/l БАП+1.0 mg/l НОК); В) MS7 (MS+0.5 mg/l БАП+1.0 mg/l 2,4-Д); С) MS8 (MS+0.5 mg/l БАП+1.0 mg/l ИОК)

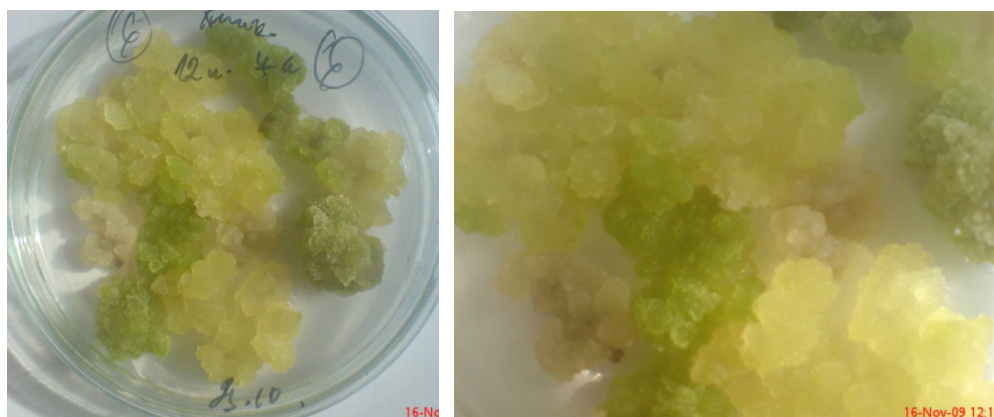
В следващ експеримент е проучен ефектът от самостоятелното участие на ИОК и в комбинация с кинетин или 2,4-Д върху индуцирането на калуси (Таблица 9). При самостоятелното добавяне на ИОК в концентрация 0.2 mg/l към хранителната среда (MS12) не е отчетено формиране на калус. След 6 седмици култивиране на тази среда е наблюдавано покафеняване и отмиране на експлантите. Същият резултат е наблюдаван и при хранителна среда MS14, която съдържа ИОК (0.2 mg/l) и кинетин (1mg/l). При комбиниране обаче на същото количество кинетин с 2,4-Д (0.1 mg/l) в средата (MS15), процентът на индуцираните калуси от котиледони е 76.7%, а този от хипокотили – 86.7%. И двата вида сегменти формират компактен, бледозелен калус с ниска интензивност на растеж. При участието на двата ауксина 2,4-Д (0.1 mg/l) и ИОК (0.2 mg/l), без цитокинин в хранителната среда (MS13) честотата на калусообразуване е подобна на тази отчетена на среда MS15, но формираните калуси са с по-добър растеж. Комбинацията от кинетин в концентрация 1 mg/l с 2,4-Д (0.1 mg/l) и ИОК (0.2 mg/l) в среда (MS16) предизвиква по-висок отговор и на двата вида експлантите (80.0 и 93.3% съответно), а индуцираният калус е с рехав консистенция, светложълт цвят и с най-добър растеж (Фиг. 12). При завишаване нивото на кинетина (2.0 mg/l) в хранителната среда (MS17), процентът на формирания калус се увеличава (83.3% от котиledonите и 96.7% от хипокотилите), но интензивността на растежа е по-ниска. Индуцираните калуси показват най-добри резултати по отношение растеж, развитие и структура на хранителна среда MS16. Втора по ефективност е хранителна среда MS13. Двете среди са използвани както за получаване на неорганизирано растяща биомаса, така и за поддържане на получените култури. Разликите в измерените свежи тегла на калусите, получени на установените оптимални среди (MS13 и MS16) могат да се видят на Фиг. 13.

Повечето автори, работещи с други представители от семейство Asteraceae съобщават за индуциране на калуси на хранителни среди MS, съдържащи различни концентрации БАП и НОК (Dhar and Joshi 2005; Mohebodini et al. 2011; Amudha and Shanthi 2011; Li et al. 2012; Zayova et al. 2012), БАП и 2,4-Д (Janarthanam et al. 2009; Guruchandran and Sasikumar 2013; Sharma et al. 2013), БАП, кинетин, НОК, и 2,4-Д (Paduchuri et al. 2010; Wani et al. 2010).

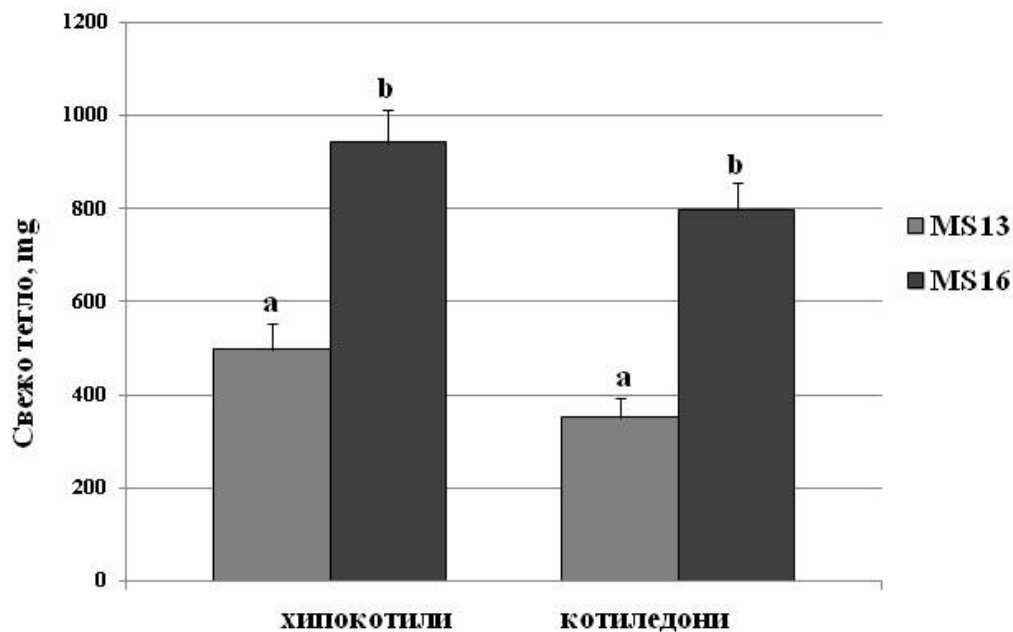
Таблица 9. Влияние на кинетин, 2,4-Д и ИОК върху индуцирането на калуси от експланти на семеначета при *A. montana*

Растежни регулатори, mg/l				Индуцира ни калуси, %	Характеристика на калусите		
№ среда	Кн	2,4-Д	ИОК		Консистенция	Цвят	Интензи вност на растежа
КОТИЛЕДОНИ							
MS12			0.2	0	-	-	-
MS13		0.1	0.2	66.7	рехав	светложълт	+++
MS14	1		0.2	0	-	-	-
MS15	1	0.1		76.7	компактен	светлозелен	+
MS16	1	0.1	0.2	80.0	рехав	светложълт	+++
MS17	2	0.1	0.2	83.3	рехав	светлозелен	++
ХИПОКОТИЛИ							
MS12			0.2	0	-	-	-
MS13		0.1	0.2	80.0	рехав	светложълт	+++
MS14	1		0.2	0	-	-	-
MS15	1	0.1		86.7	компактен	светлозелен	+
MS16	1	0.1	0.2	93.3	рехав	светложълт	+++
MS17	2	0.1	0.2	96.7	рехав	светложълт	++

Легенда: (-) няма ефект; (+) ниска интензивност; (++) средна интензивност; (+++) висока интензивност на растежа

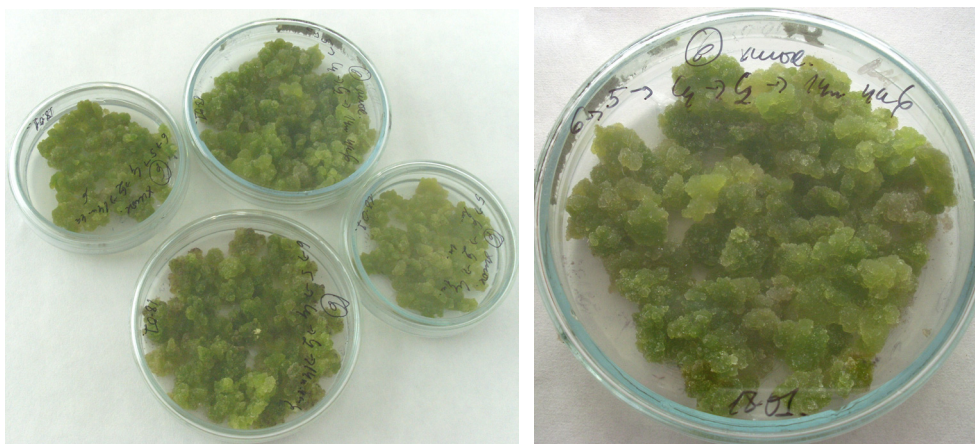


Фиг. 12. Субкултивиран калус от *A. montana* на MS16 хранителна среда (MS + 0.1 mg/l 2,4-Д + 0.2 mg/l ИОК + 1 mg/l кинетин)



Фиг. 13. Влияние на растежните регулатори върху свежото тегло на калуси от *A. montana*

За продължителното поддържане на калусни култури е необходимо прехвърлянето им на хранителна среда MS, обогатена с аденин (20 mg/l), 2.4-Д (0.05 mg/l), GA₃ (0.2 mg/l), глутамин (100 mg/l) и хидролизат на казеина (500 mg/l). Получена е три годишна калусна линия, произхождаща от хипокотили, която запазва растежните си характеристики (Фиг. 14). Индуцираните рехави калуси успешно са използвани за получаване на фино агрегирани суспендиални култури.



Фиг. 14. Тригодишна калусна линия (от хипокотили на *A. montana*)

IV. Индиректен органогенезис и растителна регенерация

IV.1. Индуциране и растеж на калуси от листни експланти

Инициирането на недиференцирани клетки започва в част от растителната тъкан при използване на растежни регулатори за формиране на калус. Индуцирането на калус

стана видимо на повърхността на експлантите и на наранените краища след 21 дни. Наблюдавана е значителна разлика във формирането на калусите в зависимост от вида на използвания ауксин. Ауксинът 2,4-Д в концентрация 0.1 mg/l предизвиква дедиференцирането на клетките. Отчетен е висок процент на индуциран калус (90%) по наранените повърхности на експлантите. Калусите са бледожълти, рехави (Таблица 10, Фиг. 15a). В нашето проучване 2,4-Д се оказва по-ефективен за формиране на калус, отколкото ИОК. Едва 40% от експлантите формират калус на MS хранителна среда, съдържаща 0.1 mg/l ИОК. Калусите са бледожълти, воднисти и в следствие не показват органогенни способности. При използване на същия ауксин (0.2 mg/l) в хранителната среда калусообразуване при експлантите от хипокотили и котиледони не е отчетено.

IV.2. Индиректен органогенезис

Тествана е регенерационната способност на калуси, произхождащи от листа, изрязани от *in vitro* микроразмножени растения. Броят на регенерантите от експлант е силно повлиян от състава на хранителната среда и вида на растежните регулатори. Калусите, субкултивирани на контролната среда MS без растежни регулатори, не формират пъпки и постепенно загиват. Хранителна среда MSO4, съдържаща БАП и ИОК, също не е ефективна за растителна регенерация. В нашия протокол 2,4-Д (0.1 mg/l) в комбинация с БАП (0.5 mg/l) и хидролизат на казеина (1 g/l) индуцира развитието на органогенен калус в листните експлантите. Този хормонален състав е избран сред много тествани комбинации (данните не са показани). Калусите са бледокремави на цвят със зърнеста структура (Фиг. 15b). Когато калусите са субкултивирани на хранителна среда MSO5, съдържаща 1.0 mg/l БАП и 0.1 mg/l 2,4-Д, е наблюдавана растителна регенерация (Таблица 10). Появата на зелени участъци в калусите е сигнал за инициране на процеса на органогенезис. След 4 седмици на тази хранителна среда калусите започват да продуцират пъпки, които се развиват в растения.

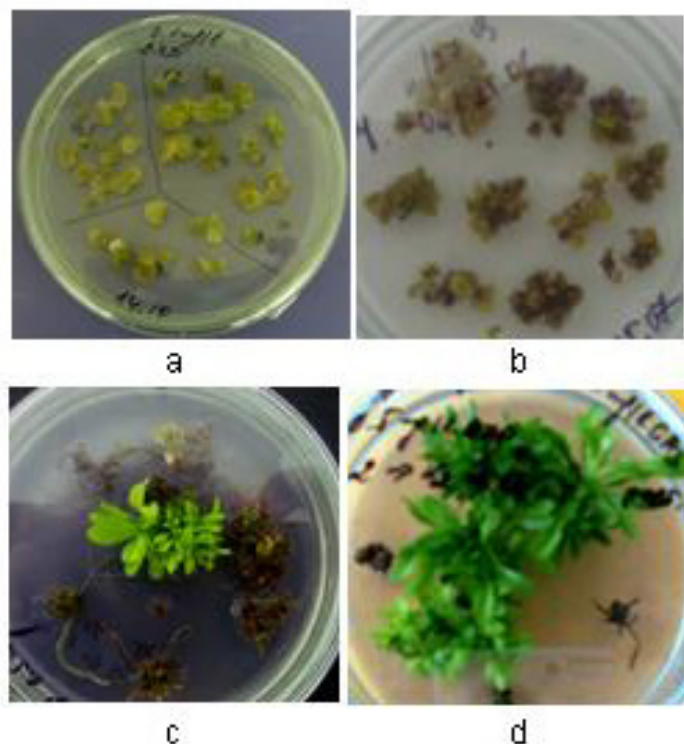
Таблица 10. Влияние на растежните регулатори върху индуцирането на калуси и пъпки от листни експлантите при *A. montana*

Среда	Растежни регулатори, mg/l			Пасаж	Индуцирани калуси, %	Характеристика на калуса	Регенерирани пъпки, %	Брой пъпки/ калус
	2,4-Д	ИОК	БАП					
MSO1	0.1	-	-	I	90	РСЖ	-	-
MSO3	0.1	-	0.5	II	-	ГСК	-	-
MSO5	0.1	-	1.0	III	-	ГТК с корени	30	0.86±0.11
MSO5	0.1	-	1.0	IV	-	ГТК	50	2.12±0.27
MSO2	-	0.1	-	I	40	ВСЖ	-	-
MSO4	-	0.1	0.5	II	-	ВТЖ	-	-
MSO6	-	0.1	1.0	III	-	ВТЖ	-	-

Легенда: Рехав светложълт (РСЖ); Гранулиран светлокремав (ГСК); Гранулиран тъмнокремав (ГТК); Воднист светложълт (ВСЖ); Воднист тъмножълт (ВТЖ)

Наблюдаваната честота на органогенезис не е висока 30% и 50% (съответно в трети и четвърти пасаж). Средният брой на пъпките е 0.86 за калус, като някои от калусите продуцират дълги корени (Фиг. 15c). При следващото субкултивиране на същата среда, броят на калусите, генериращи пъпки се увеличава (2.12), след което процесът затихва.

Пъпките се развиват в цели растения (Фиг. 15d). Подбраните оптимални концентрации на растежните регулатори и тяхната комбинация стимулират растежа на пъпките и появата на първите листа. Получените здрави растения са готови за по-нататъшно *in vitro* култивиране. Първоначалните резултати показват, че БАП подпомага процеса на индиректен органогенезис, като стимулира клетките да достигнат до компетентна фаза на делене.



Фиг. 15. Индуциране на калуси и последваща регенерация от листни експланти на *A. montana*: а) Формиране на калус на MS среда, допълнена с 0.1 mg/l 2,4-Д; б) Растеж на калус на MS среда, съдържаща 0.5 mg/l БАП и 0.1 mg/l 2,4-Д; в) и д) Регенерация на пъпки на MS среда с 1 mg/l БАП и 0.1 mg/l 2,4-Д

IV.3. Мултиплициране на получените регенеранти

Тъй като честотата на растителна регенерация от калусни култури не е висока, регенерираните минирастения от *A. montana* са мултиплицирани на различни MS среди, съдържащи четири вида цитокинини в комбинация с 0.1 mg/l ИОК. Оптимална хранителна среда за микроразмножаване е MS, съдържаща БАП (1 mg/l) и ИОК (0.1 mg/l), където са отчетени над 16 регенеранта от експлант със средна височина (1.86 cm).

V. Индуциране на нетипични корени (hairy roots) чрез трансформация с *A. rhizogenes*

V.1. Инициране на hairy roots и доказване на трансгенната им природа

В настоящото изследване hairy roots се формират след 18-я до 25-я ден от трансформацията на листни експланти, отделени от основата на листа, близо до листната дръжка. Нетипични корени са индуцирани и при експланти от върхната част, но честотата им е значително по-ниска. Корените, развили се след инфектирането са с типичен за hairy roots фенотип – бърз растеж, странични разклонения и отсъствие на

ясно изразен геотропизъм. В нито един от проведените експерименти при използваните условия за култивиране, контролните експланти не формират корени. Установената ефективност на генетичната трансформация варира между 4.8 и 12% (Таблица 11).

Таблица 11. Честота на трансформация при листни експланти на *A. montana*

Листни експланти	Начин на заразяване	Период на ко-култивиране, дни	Среден брой заложи експланти	Ден на поява на hairy roots	Честота на трансформация %
МР	БК	10	83	21	4.8 ^a
МР	БС, 20 min OD ₆₀₀ =0.9	3	55	25	10.9 ^{bc}
МР	БС, 40 min. OD ₆₀₀ =0.8	3	35	19	11.4 ^c
МР	БС, 20 min. OD ₆₀₀ =0.7	3	45	23	6.6 ^{ab}
Р	БК	10	51	20	5.8 ^a
Р	БС, 40 min OD ₆₀₀ =0.8	3	75	18	12 ^c

МР – Лист от микроразмножени растения;

Р – Лист от растения, регенерирани от калус;

БК – Намазване с бактериална култура;

БС – Потопяване в бактериална суспензия.

Начинът на заразяване на изходните експланти оказва влияние върху честотата на формираните hairy roots. Намазването на листни сегменти от микроразмножени растения с активно растяща бактериална култура води до индуциране на 4.8% hairy roots в сравнение с 10.9% при използване на бактериална суспензия. Същата тенденция е наблюдавана и при прилагането на двата метода на инокулиране на листа от растенията, регенерирани от калус (5.8 и 12%). Не са установени значителни различия в ефективността на формиране на hairy roots при експланти от микроразмножени или регенерирани растения.

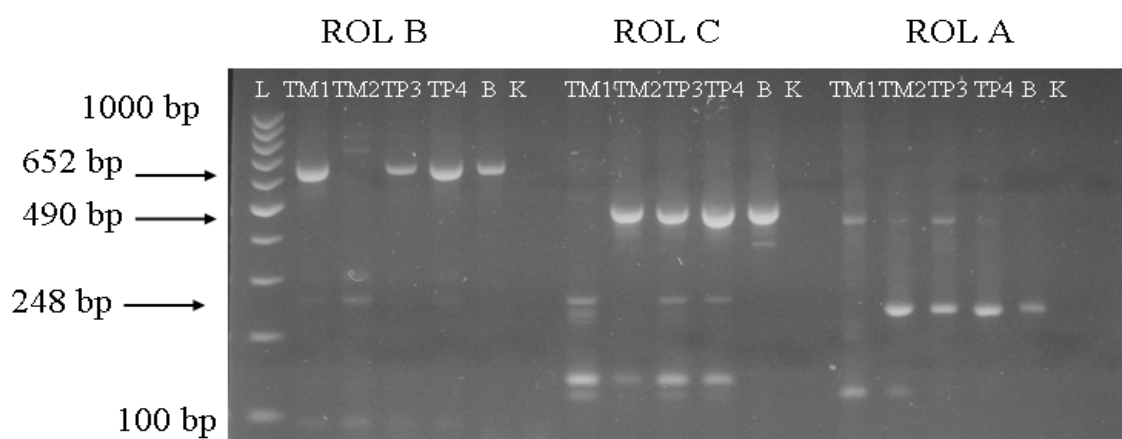
Hairy roots са индуцирани при заразяване на експлантите с бактериална суспензия с плътност в диапазона от 0.7 до 0.9 при OD₆₀₀. След инкубиране в суспензия с по-ниска плътност (OD₆₀₀= 0.3-0.6), растителните експланти се запазват зелени без никакви признаци на бактериалната инфекция по време на ко-култивирането за период от 3 до 5 дни. По-високите концентрации (OD₆₀₀=1-1.5), от тази определена като оптимална (OD₆₀₀=0.8) предизвикват образуване на плътна бактериална пелена. Това най-често води до силна реинфекция в следващите пасажии на свежа среда дори в присъствие на високи дози цефотаксим. Бактериалната реинфекция влияе негативно

върху регенеративната способност на растителната тъкан, в резултат на което честотата на трансформационните събития е ниска.

Друго условие за успешен генен пренос е инокулирането на растителния материал с бактерията за период от 20 или 40 min. При по-малка продължителност на заразяването от 5 до 15 min не е наблюдавано развитие на бактерията. Ко-култивирането е много важна стъпка в процеса на трансформация. Прикрепването на бактериалните клетки към растителните, трансферът и интегрирането на Т-ДНК се реализират през този етап. При удължаване на периода на ко-култивиране на експлантите с бактерията – от 3 дни (при заразяване с бактериална суспензия) и 10 дни (при заразяване чрез намазване с бактериална култура) са постигнати по-добри резултати. Ко-култивирането от 1-2 дни е недостатъчно, за да се завърши процеса на трансформация, но по-дългия период от 10 дни води до некроза на експлантите, което затруднява индуцирането на корени. Установена е оптималната концентрация на цефотаксима (200 mg/l), при която бактерията обикновено се елиминира след пет субкултивирания, а експлантите запазват добра жизненост. Високите концентрации на антибиотика (300 или 400 mg/l) премахват бактериалното заразяване, но това е съпроводено с потъмняване и некроза на растителните тъкани.

Доказване трансгенната природа на формираните нетипични корени

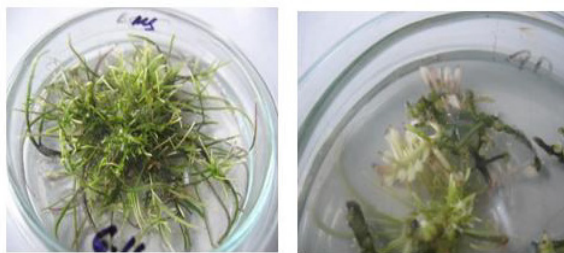
PCR техниката дава възможност за многократно размножаване на район от ДНК, разположен между два праймера, което в растителните биотехнологии се използва за рутинно доказване на присъствието на трансгена в генома на изследваните растения. Търсената секвенция след това може да бъде визуализирана. За доказване присъствието в растителния геном на *rolA*, *rolB* и *rolC* гените, клонове hairy roots са анализирани чрез PCR реакция. Като положителна контрола е използвана бактериална ДНК. Амплификацията на участък от 248 bp при три от изпитаните четири клона трансгенни корени (TM2, TP3 и TP4) е потвърждение за наличието на *rolA* гена (Фиг. 16). С *rolB* праймери се наблюдава амплификация на фрагмент от 652 bp в TM1, TP3 и TP4. Амплификацията на участък от 490 bp в TM2, TPM3 и TPM4 е потвърждение за наличие на *rolC* гена. Амплификационен сигнал не е открит в отрицателната контрола (нетрансформираните контролни корени).



Фиг. 16. PCR анализ на предполагаеми трансгенни корени от *A. montana* (L-молекулен стандарт, TM1 TM2, TP3 и TP4 – ДНК от корени, получени от различни трансформации, В – плазмидна ДНК от *A. rhizogenes*, К- ДНК от контролни нетрансформирани корени).

V.2. Растеж, развитие и морфологична характеристика на получените нетипични корени

По отношение на морфологията си, индуцираните на MS хранителна среда hairy roots, са разделени на два типа: 1) с характерен за тези корени фенотип (бързорастящи, с много странични разклонения) и 2) удебелени калусиращи, бавнорастящи корени (Фиг. 17). При втория тип е наблюдавано постепенно забавяне на растежа и загиване след няколко пасажа. Съществуването на морфологични различия сред hairy roots се свързва с различия в интегрирането на гени от T_L-ДНК и T_R-ДНК областите (Grant et al. 1991; Batra et al. 2004; Bandyopadhyay et al. 2007).



Hairy roots с типичен фенотип



Калусен тип hairy roots

Фиг. 17. Морфологични типове hairy roots при *A. montana*

Влияние на различните хранителни среди върху растежа и развитието на hairy roots

Проучена е ролята на основните хранителни среди MS, B5 и SH по отношение темпа на нарастване на корените и натрупването на биомаса при нетрансформирани корени (контрола) и четири трансгенни клонове от *A. montana* (Таблица 12). Нетрансформирани корени, култивирани и на трите вида хранителни среди почти не нарастват, липсват разклонения и свежото им тегло почти не се променя в сравнение с първоначалното (Таблица 12). За разлика от тях hairy roots, култивирани на трите проучвани хранителни среди се характеризират с висок темп на нарастване, изобилие от странични разклонения и натрупване на значително повече биомаса от нормалните корени. Измерените растежни параметри на трансгенните корени и при четирите клона са с най-високи стойности на MS среда, следвани от тези на B5 среда, а най-ниски са тези на SH среда. Hairy roots, култивирани на MS среда формират дълги корени, с голям брой разклонения и натрупват значително количество биомаса, измерена чрез свежото тегло. На тази среда корените от клон TP4 са с най-високи стойности по отношение на проучваните параметри (средна дължина от 4.72 cm; брой разклонения за корен с дължина 1 cm - 9.15 и средно свежо тегло 3.50 g) в сравнение с тези на другите три клона (TM1, TM2 и TP3). Същата тенденция е установена за клон TP4 и при другите

две хранителни среди. Получената при него биомаса е 7.6 пъти повече в сравнение с тази на нетрансформирани корени на MS среда.

Таблица 12. Влияние на хранителната среда върху растежните параметри на hairy roots от *A. montana*

Хранителна среда	Клон	Дължина на корен, cm	Брой странични разклонения, cm	Дължина на разклонения, cm
MS	НТ	2.16±0.02 ^a	0	0
	ТМ1	3.81±0.11 ^b	4.70±0.33 ^a	0.44±0.03 ^a
	ТМ2	4.11±0.13 ^b	5.45±0.51 ^a	0.56±0.05 ^{ab}
	ТР3	3.96±0.12 ^b	4.90±0.33 ^a	0.68±0.04 ^c
	ТР4	4.72±0.19 ^c	9.15±0.44 ^b	0.62±0.04 ^{bc}
B5	НТ	2.24±0.03 ^a	0	0
	ТМ1	2.50±0.10 ^{ab}	3.20±0.31 ^b	1.34±0.09 ^b
	ТМ2	2.66±0.12 ^b	3.65±0.27 ^{ab}	0.95±0.08 ^a
	ТР3	2.70±0.12 ^b	4.25±0.28 ^b	1.22±0.10 ^b
	ТР4	3.87±0.13 ^c	6.10±0.28 ^c	1.18±0.09 ^{ab}
SH	НТ	2.13±0.02 ^a	0	0
	ТМ1	2.27±0.04 ^a	1.95±0.35 ^a	0.41±0.03 ^a
	ТМ2	2.31±0.06 ^a	2.25±0.38 ^a	0.51±0.04 ^a
	ТР3	2.65±0.07 ^b	1.85±0.34 ^a	0.49±0.03 ^a
	ТР4	3.19±0.10 ^c	4.25±0.47 ^b	0.76±0.08 ^b

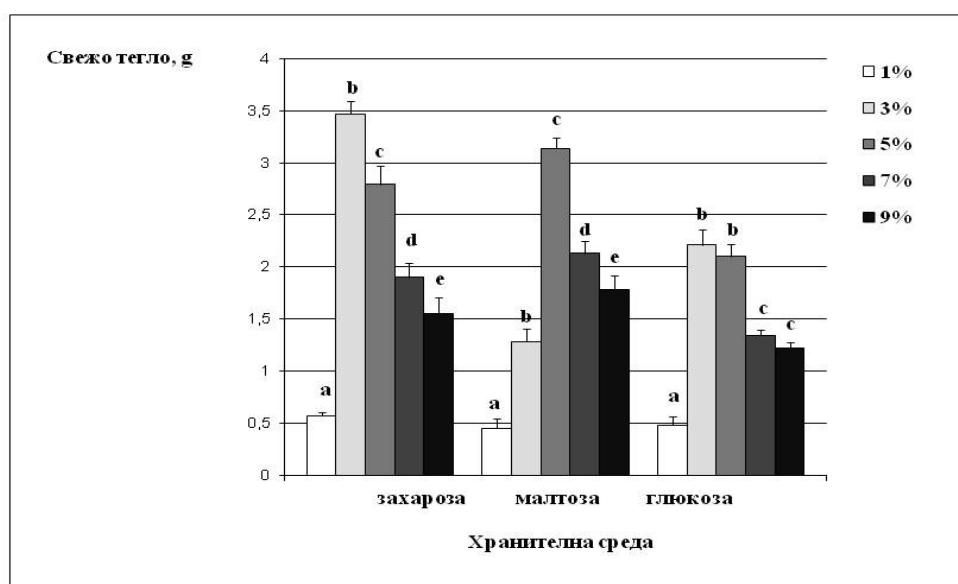
Легенда: Нетрансформирани корени (НТ), Трансформирани корени (Т)

Втората по ефективност хранителна среда, която оказва положително влияние върху растежните характеристики на нетипичните корени е B5 (средна дължина от 3.87 cm; 6.10 броя разклонения за корен на 1 cm и средно свежо тегло 3.0 g). Хранителна среда SH продуцира значително по-малко разклонения (4.25 за 1 cm) и свежо тегло (2.21g.). За разлика от корените на MS среда, които са зелено оцветени, тези на B5 и SH, са безцветни или антоцианови. Различията в степента на растежа и разклоняването на нетипичните корени на селектираните от нас клонове - ТМ1, ТМ2, ТР3 и ТР4, вероятно са резултат от интеграцията и експресията на раличните *rol* гени в растителния геном. Може да се предположи, че бързият растеж и големият брой разклонения на hairy roots при клон ТР4 се дължат на доказаното присъствие в генома му на *rolA*, *rolB* и *rolC* гените. Това го прави перспективен, защото бързият растеж на културите от hairy roots е задължително условие за култивиране в биореактор с цел получаване на БАВ.

Влияние на различни въглехидратни източници върху растежа и развитието на hairy roots

Проучено е влиянието на различни въглехидратни източници върху растежа, развитието и натрупването на биомаса при клон ТР4, който се отличава с най-добър растеж. Сравнителният анализ показва, че растежът и развитието на корените са най-

добри на среди, съдържащи захароза (Фиг. 18). Наблюдавано е, че нарастването на трансгенните корени започва най-бързо (на 3-я ден) на среда с този въглехидратен източник. От всички изпитани концентрации, най-добър резултат върху нарастването на корените е получен при 3 и 5% захароза, където параметрите като средна дължина на корена (4.52 и 4.22 cm, съответно); брой разклонения/cm корен (8.35 и 7.40, съответно) са най-високи, което рефлектира в по-голямо свежо тегло и натрупана биомаса (3.47 и 2.79 g, съответно). Малтозата се оказва вторият по ефективност въглехидратен източник за растежа и развитието на корените. Оптимална степен на нарастване е установена при съдържание 5% малтоза в хранителната среда, където всички изследвани параметри имат най-високи стойности. Средното свежо тегло при тази концентрация е 3.14 g.



Фиг. 18. Нарастване на hairy roots при *A. montana* в зависимост от вида и концентрацията на въглехидратния източник

Глюкозата има по-слаб ефект върху степента на нарастване и натрупването на биомаса. Оптималната ѝ концентрация е 3%, при която измерените параметри са по-високи в сравнение с другите изпитани концентрации. При всички изследвани въглехидратни източници в концентрация 1% се наблюдава най-слаб растеж на корените. Високите концентрации на захарите (9%) водят до промяна в цвета на корените (става антоцианов), а растежът им се подтиска.

VI. Фитохимични изследвания

VI. 1. Определяне на количеството на сескитерпенови лактони в листен материал и в цветове от *in vitro* получени растения

Основните компоненти, отговорни за фармакологичните свойства на *A. montana*, са сескитерпеновите лактони от 10 α -метилпсевдогуайанов тип като хеленалин, 11 α ,13-дихидрохеленалин, и техни късоверижни естери. Резултатите от ^1H ЯМР анализа показват, че главните сескитерпенови лактони в изследваните екстракти от *in vitro* растения, получени от семена от три различни популации са тиглинови и метакрилови естери на хеленалина и 11 α , 13-дихидрохеленалина. Количеството на общите лактони, хеленанолидите (H), 11 α , 13-дихидрохеленанолидите (DH), както и на индивидуалните

естери (Н-Tig, Н-Met, dH-Tig, dH-Met) са представени в Таблица 13. Общото съдържание на сескитерпенови лактони в *in vitro* листен материал от всички изследвани популации е високо и достига 15.8 mg/g (произход Украйна), 22.7 mg/g (произход Германия) и 16.2 mg/g (произход Австрия). Различията в съдържанието на лактоните в проучваните листни проби вероятно са свързани с произхода на използваните за култивиране семена, тъй като растенията са култивирани при еднакви условия. Данните показват, че в зелените листа на *in vitro* растенията от *A. montana* се съдържат два типа сескитерпенови лактони – хеленалинов (HL) и дихидрохеленалинов (DHL), като дихидрохеленанолидите преобладават в пробите. В оранжерийните растения (*ex vitro*) не са установени лактони от хеленалинов тип. Наличието на сескитерпенови лактони от Н-тип в *in vitro* културите и липсата им в листата на оранжерийните растения показва зависимост от възрастта на растенията или различните условия на развитието им.

Таблица 13. Количество на сескитерпенови лактони (mg/g DW) в листен материал от *in vitro* растения от *Arnica montana*, определено чрез ¹H ЯМР

Компоненти	АУ (<i>ex vitro</i> сухи листа)	АУ (<i>in vitro</i> сухи листа)	АГ (<i>in vitro</i> сухи листа)	АА (<i>in vitro</i> сухи листа)
Н-Tig	-	0.8	0.5	-
Н-Met	-	2.8	1.7	0.6
dH-Tig	0.6	0.8	1.5	1.3
dH-Met	3.3	4.0	9.7	8.1
HL	-	6.1	3.3	0.8
DHL	6.3	9.7	19.4	15.4
TL	6.3	15.8	22.7	16.2

Легенда: Н-Met (хеленалин метакрилат); dH-Met (11α,13-дихидрохеленалин метакрилат), Н-Tig (хеленалин тиглат); dH-Tig (11α,13-дихидрохеленалин тиглат); HL–хеленалинов тип лактони; DHL – дихидрохеленалинов тип лактони; TL (тотално съдържание на сескитерпенови лактони)

В предишно изследване е установено, че съдържанието на дихидрохеленалиновия тип лактони се увеличава с възрастта на растенията (Schmidt et al. 1998). Авторите съобщават, че превръщането на сескитерпенови лактони от Н-тип в DH-тип се подпомага от ензима хидрогеназа, чиято активност достига своя максимум няколко седмици след формирането на листата. Добре развитите оранжерийни растения са приключили напълно процесът на трансформиране на Н в DH и в техните листа са определени само сескитерпенови лактони от DH-тип. Метакрилатните естери доминират значително над тиглатите във всички изследвани екстракти. 6-О-метакрилоил-11α,13-дихидрохеленалин е основен естер в пробите и съотношението Н-Met към dH-Met достига 1:13.5 в растенията с произход Австрия. В нашите изследвания общото лактонно съдържание в листата на оранжерийните растения от произход Украйна е 6.3 mg/g или 2.5 пъти по-малко от това в листния материал от *in vitro* културите. Основен компонент е dH-Met, който е почти в еднакво количество в двата вида проби: 3.3 mg/g (оранжерийни растения) и 4.0 mg/g (*in vitro* растения). Отчетеното съдържание на лактони в листен материал от *in vitro* получени двегодишни растения, отглеждани в местността Беглика е много ниско (0.68 mg/g) (данните не са представени в таблицата). Различните условия (*in vitro*, *ex vitro*, *in vivo*) на култивиране са едни от важните фактори за наблюдаваните количествени и качествени разлики в лактонния състав на културите при *A. montana*.

За количествена оценка на сескитерпеновите лактони в *A. montana* са използвани още ГХ и ГХ/МС методи. Намерени са подходящи ГХ условия за оптимално разделяне на съдържащите се сескитерпенови лактони и чрез ГХ/МС са идентифицирани 12 индивидуални вещества. Това са естери - съответно ацетати, изобутирати, метакрилати, изовалерати, 2-метилбутирати и тиглати от двата типа, хеленалинов и дихидрохеленалинов. За количествена оценка на лактонния състав е приложен калибрационен метод използвайки сантонин като стандарт. При сравняване на влиянието на различни системи за микроразмножаване върху общото лактонно съдържание е установено, че то е най-високо в листния материал на растенията, произхождащи от системата за временно потапяне (15.34 mg/g), следвано от това на растенията събрани от статичната течна култура (13.81 mg/g) и най-ниско е в тези от агаровата среда (7.62 mg/g) (Таблица 14).

Таблица 14. Съдържание на сескитерпенови лактони (mg/g DW) в *in vitro* листа от *A. montana*, произхождащи от три различни системи за култивиране, определено чрез газова хроматография

Сескитерпенови лактони	Агарова култура	Статична течна култура	TIS RITA®
H-Ac	0.34	0.33	0.08
dH-Ac	1.58	2.50	3.70
H-iBu	0.00	0.06	0.02
dH-iBu	0.76	0.61	1.32
H-Met	0.12	1.92	0.32
dH-Met, следи H- 2MeBu	3.26	3.91	6.78
H-iVal	0.00	0.17	0.02
dH-2MeBu	0.14	0.13	0.30
dH-iVal	0.82	2.06	1.60
H-Tig	0.16	0.25	0.16
dH-Tig	0.44	1.87	1.04
HL	0.62	2.73	0.60
DHL	7.00	11.08	14.74
TL	7.62	13.81	15.34

Легенда: H-Ac (хеленалин ацетат); dH-Ac – (11 α ,13-дихидрохеленалин ацетат); H-iBu (хеленалин изобутират); dH-iBu (11 α ,13-дихидрохеленалин изобутират); H-Met (хеленалин метакрилат); dH-Met (11 α ,13-дихидрохеленалин метакрилат), следи H-2MeBu (хеленалин 2-метилбутират); H-iVal (хеленалин изовалерат); dH-2MeBu (11 α ,13-дихидрохеленалин 2-метилбутират); dH-iVal (11 α ,13-дихидрохеленалин изовалерат); H-Tig (хеленалин тиглат); dH-Tig (11 α ,13-дихидрохеленалин тиглат); общо H – хеленалинов тип лактони; DH – дихидрохеленалинов тип лактони; TL - тотално съдържание на сескитерпенови лактони

Дихидрохеленалинът е два пъти повече в растенията от TIS (14.74 mg/g) в сравнение с растенията, произхождащи от агаровата хранителна среда (7.00 mg/g). Съдържанието на дихидрохеленалин достигна 11.08 mg/g в растенията, събрани от статичната течна култура. Концентрацията на хеленалин е почти еднаква в растенията от TIS и агарова среда (0.62 и 0.60 mg/g) и четири пъти повече в статичната течна култура (2.7 mg/g). Съотношението между DH:H тип естери е по-високо в растенията,

култивирани в TIS в сравнение с това в растенията от агаровата и статичната течна култура. Основните сескитерпенови лактони в изследваните листни екстракти са метакрилати и ацетати на дихидрохеленалина. По-високото количество лактони, отчетено в листата на растенията, произхождащи от TIS и от статичната течна среда в сравнение с това в растенията от агаровата среда вероятно е свързано с по-ефективното усвояване на хранителните вещества в течна среда. Освен това може да се предположи, че потапянето, което се осъществява в TIS системата може да предизвиква стресова реакция в растенията, водеща до активиране на различни гени, включени в биосинтезата на сескитерпенови лактони.

Направен е и сравнителен анализ на съдържанието на сескитерпенови лактони в цветове на двегодишни *in vitro* и *in vivo* получени растения, отглеждани в експерименталната база в Беглика, Родопите. *In vivo* растенията са получени по конвенционалния начин на вегетативно размножаване и са любезно предоставени от доц. Евстатиева и доц. Виткова от ИБЕИ, БАН. Количественият състав на лактоните, както и отделните естери са представени в Таблица 15.

Таблица 15. Съдържание на сескитерпенови лактони (mg/g DW), определено чрез газова хроматография в цветове на *A. montana*, събрани от растения, размножени *in vitro* и *in vivo* с произход Германия и Украйна

Сескитерпенови лактони*	Германия		Украйна	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
H-Ac	0.3	0.11	0.29	0.07
dH-Ac	0.19	0.68	0.15	0.5
H-iBu	0.43	0.25	0.38	0.14
dH-iBu	0.15	1.44	0.13	1.06
H-Met	0.3	0.14	0.41	0.08
dH-Met	0.1	0.63	0.14	0.48
H-2MeBu	0.67	0.81	0.63	0.48
dH-2MeBu	0.11	1.34	0.09	1.04
H-iVal	0.18	0.25	0.32	0.25
dH-iVal	0.1	0.4	0.12	0.3
H-Tig	0.22	0.13	0.49	0.15
dH-Tig	0.09	0.47	0.14	0.41
HL	2.10	1.69	2.52	1.17
DHL	0.74	4.97	0.77	3.79
TL	2.84	6.66	3.29	4.95

*Виж легендата на Таблица 31. Растенията, от които са събрани цветовете са отгледани в експерименталната база Беглика

За сравнение са взети проби от два произхода (Германия и Украйна) на еднаква възраст (2 години). Наблюдава се, че в *in vitro* културите общото лактонно съдържание е по-високо от това в *in vivo* размножените растения, като по-съществена е разликата за пробите от германския произход. Освен това съотношението H:DH е в полза на H в *in vivo* културите, и в полза на DH в *in vitro* пробите. В цветовете доминират изобутирати и метилбутирати съответно на хеленалина при *in vivo* растенията, и на дихидрохеленалина при *in vitro* растенията. Тъй като растенията са с еднакъв произход – съответно Германия и Украйна, наблюдаваните различия са свързани с начина, по който са получени растенията - *in vitro* култивиране и конвенционален начин на вегетативно размножаване. Освен това, натрупването на хеленанолиди и

дихидрохеленанолиди в цветовете, за разлика от листата не е свързано с възрастта, тъй като изпитаните растения са на еднаква възраст. Наблюдаваните вариации в отчетените стойности можем да свържем само с различията в условията, при които са получени двата типа растения.

В заключение, високото количество на сескитерпенови лактони в листа от *in vitro* растения, показва, че те могат да бъдат потенциален източник на тези ценни БАВ. По-високото съдържание на сескитерпенови лактони в цветовете от *in vitro* получени растения, в сравнение със съдържанието им в *in vivo* растения показва приложимостта на биотехнологичния метод на размножаване за нуждите на фармацевтичната промишленост.

VI. 2. Газово хроматографски/масспектрометричен анализ на метаболити в hairy roots

В резултат от проведения ГХ/МС анализ в hairy roots от *A. montana* са установени 48 съединения, принадлежащи към различни класове метаболити: **флаволи** (хризин); **фенолни киселини** (кафена киселина, 4-хидроксифенил лактонова киселина, протокатехова киселина, фенил лактонова киселина, хидроксibenзоена киселина); **органични киселини** (хидроксимаслена киселина, маленова киселина, фумарова киселина, ябълчна киселина, янтарна киселина, винена киселина и др.); **мастни киселини** (палмитинова киселина, миристинова киселина, линолова киселина, стеаринова киселина и др.); **аминокиселини** (аспарагин, пролин, глутамин); **захарни алкохоли** (глицерол, пентитол, арбитол), **въглеводороди**. Идентификацията на съединенията е осъществена на базата на сравнение на техните мас спектри и индекси на задържане спрямо публикуваните в достъпните бази. Компонентите с най-голямо относително съдържание са пентитол и глицитол съответно 22.7 и 17.5%. От отделните групи съединения единствено захарите и захарните алкохоли се влияят от концентрацията на съответните въглехидрати в хранителната среда. С нарастване на съдържанието на захарозата, малтозата или глюкозата в хранителната среда се наблюдава увеличаване на количеството на захари и захарни алкохоли. Така например, при повишаване на концентрацията на глюкозата от 1 до 9% в хранителната среда съдържанието на глицерола се увеличава от 0.6% до 1%. Относителното съдържание на D-глицитола (сорбитол) и дулцитола (галактитол) нараства 1.06 и 1.44 пъти при повишаване на концентрацията на глюкозата в хранителната среда. Същата тенденция се наблюдава при повишаване на съдържанието на захароза и малтоза в средата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В резултат от разработването на настоящия дисертационен труд са установени ефективни системи за калусогенезис, регенерация, микроразмножаване, *in vitro* съхраняване и генетична трансформация при планинската арника (*Arnica montana* L.). При изпитване на различни дезинфектанти и голям брой хранителни среди са определени оптималните условия за всеки етап от микроразмножаването на растенията. Ефективността на *in vitro* размножаването е подобрена чрез многократно субкултивиране на прорастъците, като в пети пасаж средният им брой от експлант достига до 12.32. Култивирането в минибиореактор TIS RITA[®] също позволява получаването на голям брой растения (18.2). Целият процес на микроразмножаване отнема около 4 месеца: 20 дни за покълване на семената и по 28 дни за всеки от етапите размножаване, вкореняване и адаптиране. В местността Беглика, Родопите, е създадено насаждение от получените *in vitro* индивиди от *A. montana*. Разработената технология може успешно да се приложи за размножаването на вида и се съобщава за първи път у нас. Доказано е по-високото съдържание на сескитерпенови лактони в листата и

цветовете от *A. montana*, получени при *in vitro* условия в сравнение с това на конвенционално размножените растения.

За първи път е разработен протокол за *in vitro* съхраняване на ценни клонове в условия на бавен растеж, при периодично субкултивиране през шест месеца. Отглеждането на растенията на хранителна среда с намалени наполовина соли, намалена захароза и добавяне на 2% манитол или 3% сорбитол е икономически значително по-изгоден начин за съхраняване на ценни форми *A. montana* в сравнение със скъпо струващите методи на криоконсервация или капсулиране.

Установен е съставът на хранителните среди, подходящи за индуциране и поддържане на бързорастящи калусни култури, чиято рехави структура, позволява натрупване на биомаса в течна хранителна среда. Създаден е оригинален протокол за индуциране на органогенезис от калус, произхождащ от листни експлант. Получените регенеранти, които ще бъдат обект на бъдещи изследвания за откриване на нови форми са с висок размножителен коефициент (16.3 прорастъка/експлант).

Известно е, че културите от hairy roots са перспективни за получаване на големи количества биомаса и продуциране на ценни метаболити. В настоящото изследване е разработена система за генетична трансформация на *A. montana* чрез високовирулентния щам *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, като постигнатата максимална честота на трансформационните събития е 12%. Подбран е бързорастящ трансгенен клон hairy roots (TR4), продуциращ флавоноиди, фенолни киселини, захари, захарни алкохоли и други метаболити. Създадената система за генетична трансформация може да намери приложение, както за синтезиране на БАВ, така и за функционален анализ на гените, изучаване на различни метаболитни пътища и други.

Използваните биотехнологични подходи в настоящата работа се прилагат за първи път при *A. montana* в България, като някои от изследванията обогатяват научната информация в световен мащаб. Получените резултати допринасят за опазване на този ценен и застрашен от изчезване лечебен вид.

ИЗВОДИ

1. Установена е оптималната схема за обеззаразяване на семена от *A. montana* (комбинирано третиране с 70% етанол и белина) и подходящия състав на хранителната среда за покълването им, осигуряващи 72% успешно въвеждане на вида в *in vitro* култура.
2. Разработен е ефективен *in vitro* протокол за масово микроразмножаване на три произхода от *A. montana*. Хранителна среда MS, съдържаща комбинацията от БАП (1 mg/l) и ИОК (0.1 mg/l) е определена като оптимална за мултиплицирането на вида и осигурява получаването на 18.2 растения от изходен експлант при култивирането им в система за временно потапяне (TIS RITA[®]).
3. Определени са оптималните параметри на условията за *in vitro* вкореняване, *ex vitro* адаптиране и аклиматизиране на растенията в естествена среда. Почвената смес в състав торф:перлит:кокосов субстрат в обемно съотношение 2:1:1 осигурява 90% преживяемост на растенията, като 60% от тях са успешно култивирани в местността Беглика, Родопите.
4. Разработен е протокол за продължително *in vitro* съхраняване на отбрани форми *A. montana* в резултат на определения подходящ състав на хранителната среда и условията за култивиране. Този икономически изгоден подход е ефективна алтернатива за запазване и интродуциране в естествени условия на застрашения от изчезване лечебен вид.

5. Определен е съставът на хранителната среда за индуциране на бързорастящ калус от хипокотили на семеначета в активен растеж, подходящ за продължително култивиране и получаване на финно агрегирани суспендиални култури.
6. Разработен е метод за индиректен органогенезис и растителна регенерация от калус, произхождащ от листни сегменти, който може да бъде използван както за генетична трансформация, така и за получаване на нови форми от този лечебен вид.
7. Доказано е високо съдържание на сескитерпенови лактони (15.8 - 22.7 mg/g), в листен материал от *in vitro* култури, както и по-високо количество на тези биологично-активни вещества (6.66 mg/g), в цветове от *in vitro* произхождащи растения в сравнение с тези, на размножените по конвенционалния начин (2.84 mg/g).
8. Установени са условията за генен пренос при *A. montana* чрез *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834) – вид на изходния експлант, начин на заразяване, продължителност на инокулиране и ко-култивиране. Отбран е клон (TP4) от hairy roots, продуциращ флавоноиди, фенолни киселини, органични киселини, захари и други БАВ, който е подходящ обект за бъдещи проучвания

ПРИНОСИ

1. За първи път в България е създадена цялостна технология за ускорено микроразмножаване, регенерация чрез индиректен органогенезис, *in vitro* вкореняване, *ex vitro* адаптиране и аклиматизиране при подходящи планински условия на застрашения лечебен вид *Arnica montana*.
2. За първи път е разработен метод за *in vitro* съхраняване на ценни форми от *Arnica montana*, който позволява шест месечно поддържане без субкултивиране при запазване на добра жизненост и размножителен коефициент на растенията.
3. Селектиран е бързорастящ трансгенен клон hairy roots (TP4) при *Arnica montana*, който продуцира флавоноиди, фенолни киселини, органични киселини, захари и други метаболити и е подходящ за мащабно култивиране в биореактор.
4. Получен е перспективен за нуждите на фармацевтичната промишленост растителен материал от *Arnica montana*, който е с *in vitro* произход и е с доказано по-високо съдържание на сескитерпенови лактони в листата и цветовете в сравнение с това на конвенционално размножените растения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amudha P, Shanthi P (2011) Indirect organogenesis and *in vitro* layering of *Acmella calva* (DC.) R.K. Jansen. from various explants Journal of Agricultural Technology 7(3): 637-648
2. Bandyopadhyay M, Jha S, Tepfer D (2007) Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*, Plant Cell Rep, 26: 599–609
3. Batra J, Dutta A, Singh D, Kumar S, Sen J (2004) Growth and terpenoid indole alkal production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration, Plant Cell Rep 23:148-154
4. Conchou O, Nichterlein K, Vömel A (1992) Shoot tip culture of *Arnica montana* for micropropagation. Planta Med 58 (1): 73-76.
5. Dhar U, Joshi M (2005) Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Rep. 24: 195–200.

6. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res 50:148–151
7. Grant JE, Dommissie EM, Christey MC, Conner AJ (1991) Gene transfer to plants using *Agrobacterium*, In: Murray DR (ed) Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford 50–73
8. Guruchandran V, Sasikumar C (2013) Organogenic plant regeneration via callus induction in *Stevia rebaudiana* Bert Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2(2):56-61
9. Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231
10. Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Lakshmi Sai G, Sekar T (2009) Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni Plant Tissue Cult. & Biotech. 19(2):133-141
11. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M (2005) GMD@CSB. DB: the Golm Metabolome Database. Bioinformatics 21:1635-1638
12. Lê CL (1998) *In vitro* clonal multiplication of *Arnica montana* L. In: Proc. Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Lands, Turin, Italy, 25-27 May 1997 Acta Hort 457:195-203
13. Lê CL (2000) Factors influencing the *in vitro* proliferation of *Arnica montana* L. In: COST 843, WG1: Developmental Biology of Regeneration, Ist Meeting, 12-15 Oct 2000, Geisenheim, Germany, pp. 29-30
14. Li J, Kang Y, Qiang S, Peng G. (2012) Propagation of goldenrod (*Solidago canadensis* L.) from leaf and nodal explants. Acta Soc Bot Pol 81(1):53-60
15. Malarz J, Stojakowska A, Dohnal B, Kisiel W (1993) Helenalin acetate in *in vitro* propagated plants of *Arnica montana*. Planta Med 59 (1):51-53
16. Moges AD, Karam NS, Shibli RA (2003) Slow growth *in vitro* preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Adv. Hort. Sci. 17(4):223-230.
17. Mohebodini M, Javaran MJ, Mahboudi F, Alizadeh H (2011) Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Australian Journal of Crop Science, 5(1):92-95
18. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15: 473-497
19. Paduchuri PY, Deogirkar GV, Kamdi SR, Kale MC, Rajurkar Madhavi D (2010) *In vitro* callus induction and root regeneration studies in *Gerbera jamesonii*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 1(2): 87-90
20. Schenk RU, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can. J. Bot. 50: 199–204
21. Schmidt TJ, Bomme U, Alfermann AW (1998) Sesquiterpene lactone content in leaves of *in vitro* and field cultivated *Arnica montana*. Planta Med 64: 268-270.
22. Sharaf SA, Shibli RA, Kasrawi MA, Baghdadi SH (2012) Slow-growth preservation of wild shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) microshoots from Jordan. J. Food Agric. Environ. 10(2): 1359-1364.
23. Sharma A, Bhansali S, Kumar A (2013) *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Eclipta alba* (L.) HASSK International Journal of Life science and Pharma Research 3(2): 43-46
24. Shibli RA, Shatnawi MA, Subaih W, Ajlouni MM (2006). *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. World J. Agric. Sci. 2:372-382.
25. Stefanache PC, Danil DD, Necula AR, Gille E (2010) Studies Regarding *In Vitro* Regeneration Of *Arnica montana* L. From Natural Populations - Bistrita Valley (Eastern Carpathians). Tomul Lvi, Fasc. 1, S.Ii A. Biologie Vegetală, pp. 33-42.
26. Surmacz-Magdzyk A, Sugier D (2012) *In vitro* propagation of *Arnica montana* L.: an endangered herbal species of great importance to medicine. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 11(2), 127-140.
27. Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. J. Gen. Virol. 26: 33-48.
28. Wani M, Pande S, More N (2010) Callus induction studies in *Tradix procumbens* L. International Journal of Biotechnology Applications 2(1):11-14
29. Weremczuk-Jeżyna I, Wysokińska H (2000) Micropropagation of *Arnica montana* L. and sesquiterpene lactones in regenerated plants. Biotechnologia 4:118-122
30. Zayova E, Dimitrova L, Nedev T, Philipov P, Stoeva D (2012) Organogenesis through callus culture of *Echinacea purpurea*, Proceeding of the 7th CMAPSEEC, 27th-31st May, 2012, Subotica, Republic of Serbia, pp. 326-331

ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания:

Petrova M., Zayova E., Vlahova M. (2013) Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. Central European Journal of Biology, 8 (5): 470-479. DOI: 10.2478/s11535-013-0157-6 (IF за 2012 =0.818)

Petrova M., Zayova E., Todorova M., Staneva J., Vitkova A., Evstatieva L. (2012) Sesquiterpene lactones contents in multiple *in vitro* shoots of three *Arnica montana* populations. Acta Horticulturae, 955: 93-99.

Petrova M., Zayova E., Yankova E., Baldzhiev G. (2011) Plant regeneration from callus culture of *Arnica montana*. Romanian Biotechnological Letters, 16 (1): 92-97. (IF 0.349)

Доклади, публикувани в пълен текст:

Petrova M., Zayova E., Evstatieva L. (2011) *In vitro* conservation by slow growth of *Arnica montana*. Biotechnology, Series F, Supplementary volume, Proceeding of the 4th International Symposium "New Researches in Biotechnology" SimpBTH2011, p. 56-62

Участия в научни форуми:

Petrova M., Zayova E., Vlahova M. (2012) Hairy roots of *Arnica montana*, an important medicinal plant. Book of abstracts – VII CMAPSEEC, 27th-31st May, 2012, Subotica, Republic of Serbia, p. 175 (постер)

Петрова М., Зайова Е., Виткова А., Евстатиева Е. (2011) Масово размножаване на *Arnica montana* L. чрез биотехнологични методи. VII национална конференция по ботаника. София 29-30 септември 2011, 68 (доклад)

Petrova M. (2009) *In vitro* cultivation of *Arnica montana* L. and acclimatization of plantlets. 8th International Symposium on "New development in green gene technology", 1-4 September 2009, Szeged, Hungary, Book of Abstracts, p. 73 (постер)

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Petrova M, Zayova E, Yankova E, Baldzhiev G (2011) Plant regeneration from callus culture of *Arnica montana*. Romanian Biotechnological Letters 16(1): 92-97.

1. Acemi A, Ozen F, Kiran R (2012) Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientalis*: A critically endangered medicinal plant, Eurasia J Biosci 6, 105-112, DOI:10.5053/ejobios.2012.6.0.13
2. Amin S, Kaloo ZA, Singh S, Altaf T (2013) Micropropagation of medicinally important plant species of family Asteraceae—a review. International Journal of Recent Scientific Research, 4 (8): 1296-1303
3. Lakshmi BJ, Reddy KJ (2012) Callus induction and Organogenesis in an Indian Box-wood (*Gardenia latifolia* Ait.) Science Research Reporter 2 (1):07-12
4. Sharma A, Bhansali S, Kumar A (2013) *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Eclipta alba* (L.) HASSK International Journal of Life Science and Pharma Research, 3(2):43-46
5. Surmacz-Magdziak A, Sugier D (2012) *In vitro* propagation of *Arnica montana* L.: an endangered herbal species of great importance to medicine, Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 11(2): 127-140

6. Tomescu CV (2011) Preliminary research regarding the initiation of *Arnica montana* L. Growing versions in ecological system, Romanian Biological Sciences, Vol. IX, No. 1-4, p. 117-118, 2011”Stefan cel Mare” University, Suceava, Romania
7. Дойчинова З (2013) Микроразмножаване на храстовиден пелин (*Artemisia chamaemelifolia* Vill., Asteraceae) – въвеждане в *in vitro* култура и влияние на растежния регулатор 6-Бензиламинопурин, Дипломна работа, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”, 58 стр.

Petrova M., K. Tasheva, N. Zagorska, L. Evstatieva (2005) *In vitro* propagation of *Arnica montana* L. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 58 (1): 67 – 72.

8. Балабанова В, Виткова А, Ташев А (2009) Изследване на семенното размножаване на *Arnica montana* L. (Asteraceae). Растениевъдни науки 46:398-401.
9. Balabanova V., Vitkova A. (2010) Peculiarities in ontogenesis of *Arnica montana* L. in Bulgaria. Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences 2 (63): 1301-130

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на научния си ръководител доц. д-р Ели Зайова за помощта в научната дейност и всеотдайната подкрепа. Признателна съм на доц. д-р Марияна Влахова за консултациите при извършването на експериментите по генетична трансформация. За съдействието и напътствията при провеждането на някои от експериментите изказвам благодарност на колегите от секции “Приложна генетика и биотехнология на растенията” (ИФРГ) и “Функционална генетика” (АБИ), на доц. д-р Милка Тодорова (ИОЦХФ), доц. д-р Люба Евстатиева (ИБЕИ), доц. д-р Антонина Виткова (ИБЕИ), доц. д-р Марина Станилова (ИБЕИ), доц. д-р Цветана Стоилова (бивш ИГ) и на първия ми учител в растителните биотехнологии проф. дн Недялка Загорска[†].

Признателна съм на семейството си за любовта, грижите и подкрепата.



Благодаря за финансовата подкрепа по проектите:

1. МУ-Б-1409/04 Установяване на биохимични маркери за генетична идентичност на лечебните растения *Gentiana lutea* L. и *Arnica montana* L. и проучвания върху възможностите за *in vitro* размножаването им; Ръководител: гл.ас.Мария Петрова
2. ДТК 02/38 Комплексно изследване на високопланински защитени, ендемични и редки лечебни растения от българската флора – опазване и устойчиво използване; Ръководител: доц. д-р Антонина Виткова (ИБЕИ), координатор за ИФРГ: доц. д-р Ели Зайова
3. BG051PO001-3.3.06-0025 Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентоспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми; Ръководител: доц. д-р Леонид Петков