



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
ЛАБОРАТОРИЯ „РАСТИТЕЛНО-ПОЧВЕНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ“

МАРИЯНА ТОДОРОВА СИЧАНОВА

***In vitro* размножаване на *Stevia rebaudiana* чрез
прилагане на аминокиселинни нанوفибри и
влияние на засушаването върху *ex vitro*
адаптираните растения**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Професионално направление

4.3. Биологически науки, Научна специалност „Физиология на растенията“

Научен консултант:

доц. д-р Мария Генева

София

2026

Дисертационният труд е написан на 163 стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: Увод – 2 стр.; Литературен обзор – 38 стр.; Работна хипотеза – 1 стр.; Цел и задачи – 2 стр.; Материали и методи – 15 стр.; Резултати – 37 стр.; Дискусия – 29 стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 2 стр. Резултатите са представени в 1 схема, 26 фигури и 9 таблици. В литературната справка са отразени 354 заглавия. Експерименталната работа е проведена в секция „Растително-почвени взаимодействия“ към Институт по Физиология на Растенията и Генетика, БАН; в лаборатория „Химия на природните вещества“ на Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия (ИОХЦФ) към БАН и в Катедра по Органична Химия при Химикотехнологичен и Металургичен Университет (ХТМУ).

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита на разширено заседание на Разширения Научен съвет на лаборатория „Растително-почвени взаимодействия“, Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, проведено на 23.06.2026г. от 11:00.

- Научно жури:**
- 1. Проф. д-р Искрен Сергиев – ИФРГ-БАН**
 - 2. Доц. д-р Десислава Тодорова – ИФРГ-БАН**
 - 3. Проф. д-р Емилия Апостолова – ИБФБМИ-БАН**
 - 4. Проф. д-р Марина Станилова – ИБЕИ-БАН**
 - 5. Доц. д-р Мирослава Жипонова – СУ-БФ**

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от ... часа в сградата на ИФРГ БАН.

1.ВЪВЕДЕНИЕ

От векове растенията се използват както за храна, така и като ценен източник на компоненти с приложение в козметичната и фармацевтичната промишленост. Уникалната структурна характеристика на вторичните метаболити и широкият им спектър на действие са в основата на създаването на много лекарствени препарати от медицински растения, които са приблизително една четвърт от всички лекарства, одобрени от Европейската агенция по лекарствата и Агенцията по храните и лекарствата на САЩ. Използването на медикаменти, създадени частично или изцяло на база на естествени източници носи своите негативи върху находищата на лечебни растения и много от тях са застрашени от изчезване. Естествените местообитания на растенията бързо се изчерпват поради изменението на климата и развиващото се земеделие.

За да се предотврати унищожаването на естествените популации на растенията, от които се извличат биологично-активни вещества, много видове се отглеждат в контролирани условия. За съжаление, това отглеждане често води до получаване на растителен материал, чиито качества не отговарят на желаните показатели. Конвенционалното им добиване от природни местообитания и посрещане нуждата от непрекъснато нарастващото търсене е твърде сложна задача. Биосинтезата на вторични метаболити чрез техниките на растителната биотехнология е подходяща алтернатива на класическите технологии и дава възможност за синтез на метаболити в растенията с висок добив и качество. Растителните *in vitro* системи позволяват отглеждането на отделни клетки, тъкани, органи или цели растения за биосинтез на биологично-активни вещества и са переспективен модел за запазване от изчезване на естествените източници на ценни съставки. Растителните биотехнологии дават възможност за разработване на методи, свързани с удовлетворяване потребностите на човечеството от храна, подправки, лекарства, горива и др.

Stevia rebaudiana Bert. е източник на стевиолови гликозиди, използвани като подсладител без калории, набиращ популярност в световен мащаб. Видът е многогодишно растение, произхождащо от Парагвай и се култивира по целия свят поради съдържанието си на високоефективни природни съединения без калорична стойност. Двата основни стевиол дитерпенови гликозида, стевиозид и ребаудиозид А, които присъстват във високи нива в

листата, осигуряват сладкия вкус на растението и са 150-300 пъти по-сладки от захарозата за човешките вкусови рецептори. Редица предклинични и клинични проучвания предполагат потенциални терапевтични и фармакологични приложения на екстрактите от стевия и техните отделни съединения, тъй като те не показват токсичност в експерименталните пътеки и проявяват дейности, подкрепящи здравето. В допълнение към различните гликозиди, листата на стевия съдържат много други съединения като флавоноиди и мастни киселини, които заедно осигуряват разнообразните биологични свойства на растението. Алтернатива на класическия начин за получаването им са растителните биотехнологии, в частност използването на растителни *in vitro* системи, продуциращи вторични метаболити. Те са особено надеждни при видове с голямо търсене или за тези, които имат ниска кълняемост и се култивират бавно и трудно в естествени условия. На тази база е възможно да се развие биотехнологичен процес, базиран на органични култури от микропрорастъци на *Stevia rebaudiana*, който осигурява контрол и управление на биосинтетичния процес, а това от своя страна води до получаване на високи добиви от целевите метаболити за кратък период, независимо от сезоните и географските ширини. Техниката на тъканна култура е благодатна за производството на високо количество посадъчен материал с по-добра адаптивност и жизнеспособност, и за подпомагане отглеждането на растения с подобро качество и с високо съдържание на стевииозид и ребаудиозид А. Необходимостта от настоящото проучване е нуждата от разработване на нова и иновативна технология за контролирано отглеждане на здрави растения стевия, с качествена биомаса и активен синтез на биологично активни метаболити. В момента изследванията продължават върху изолирането, подбирането и умножаването на варианти с високо съдържание на гликозиди, за да се отговори устойчиво на световното търсене на стевия от хранително-вкусовата и фармацевтичната индустрия, което определя и актуалността на настоящото изследване.

2.ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е оптимизиране на *in vitro* размножаването и растежните параметри на *Stevia rebaudiana*, изследване нивата на някои от синтезираните вторични метаболити под влияние на аминокиселинни нанопибри, носители на сребро, както и проучване влиянието на претретирането със сребърните наночастици като фактор за по-добра адаптация при стрес от засушаване.

За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Предварително подбиране на аминокиселинни нанопибри, модифицирани със сребърни йони: NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt, NF2-Ag salt.

2. Мултиплициране на *in vitro* култури от *Stevia rebaudiana*.

2.1. Подбор на експланти от стъблени сегменти от надземна част на микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*.

2.2. Култивиране на експлантите за пролиферация на Murashige - Skoog хранителна среда с добавяне на аминокиселинни нанопибри, носители на сребро, в концентрации (1, 10, 50 и 100 mg/L) и последващо размножаване на растенията.

2.3. Индуциране на ризогенезис.

2.4. Адаптиране и култивиране на растенията при *ex vitro* условия.

3. Морфологична характеристика на микропрорастъците, отглеждани на MS среда с добавени нанопибри в различни концентрации

4. Биохимични и фитохимични изследвания на ензимната антиоксидантна активност и съдържанието на антиоксидантни метаболити

5. Определяне на разтворими захари

6. Определяне съдържанието на стрес маркери

7. Определяне съдържанието на биологично-активни вторични метаболити (стевиозид, ребаудиозид А и общи феноли) в *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения.

8. Статистическа обработка на данните

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За настоящето проучване е използван изходен материал на *in vitro* размножени растения от *S. rebaudiana*, разработени и предоставени от бившата секция „Приложна генетика и растителна биотехнология“ към ИФРГ, БАН, с ръководител доц. д-р Ели Зайова и нейния колектив. За инициране на микроразмножаването, семена на *S. rebaudiana* (получени от компания за търговски източници на семена Stevia-Paraguay, Парагвай (PY)) са били стратифицирани и обеззаразени за получаване на асептичен материали, и са успешно въведени в култура (Zayova et al., 2013; Zayova et al., 2017; Zayova et al., 2022).

3.1. *In vitro* култивиране

Стъблени сегменти на микропрорастъци, съдържащи листен възел бяха асептично изрязани и култивирани върху MS среда без растителни растежни регулатори или други добавки (контрола) или MS среда, съдържаща 1.0 mg L^{-1} 6-бензиламинопурин (BAP) (C+BAP). Хранителната среда MS с добавяне на 1.0 mg L^{-1} BAP е подбрана като оптимална за микроразмножаване от предишно проучване (Zayova et al., 2013). За последващите изследвания, към MS хранителната среда са добавени NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, при вариращи концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L^{-1} . По 1 експлант беше поставен в епруветки $140 \times 20 \text{ mm}$, на 10 ml среда за 4 седмици. Всяко третиране включваше 40 експланта, залагани на MS среда с четирите вида аминокиселинни нанофибри, носители на сребърни йони, в четири изпитвани концентрации. Изследването е осъществено в три независими повторения, като данните са представени като средноаритметични стойности.

Стойността на pH на всички използвани хранителни среди беше 5.7-5.8. При необходимост pH се коригираше за достигане на желаната стойност чрез добавяне на 1N NaOH или 1N HCl. Стерилизацията на материалите, нужни за експеримента и на хранителните среди се осъществяваше чрез автоклавиране при налягане 1.1 kg cm^{-2} при 121°C в продължение на 20 мин.

Всички *in vitro* култури се поддържаха в камера за растеж при $24 \pm 2^\circ\text{C}$ и 16-часов фотопериод при $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ осветяване, осигурено от флуоресцентни лампи (40W

студено бяла светлина) по време на всички етапи на микроразмножаването. Експлантите се проверяваха ежедневно през първите седмици за симптоми на замърсяване, както и за признаци на растеж и развитие.

3.2. *Ex vitro* адаптация на растенията към почвен субстрат, аклиматизация и засушаване

На 28-мия ден от култивирането, растенията с добре развита коренова система бяха внимателно отстранени от епруветките и техните корени бяха измити за отстраняване на агара. След това бяха прехвърлени на малки съдове (8 см в диаметър), съдържащи смес от почва, пясък и перлит в обемно съотношение 1:1:1. Растенията се поддържаха в камера за растеж при 25 ± 1 °C и 16-часов фотопериод при $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ осветяване, осигурено от флуоресцентни лампи (студено бяла светлина). Растенията бяха покрити с прозрачна полиетиленова мембрана, за да се осигури висока влажност (90%). След две седмици беше стартирано закаляване на растенията чрез постепенно отстраняване на полиетиленовото покритие в продължение на още две седмици. След едномесечната адаптация, микроразмножените растения бяха прехвърлени в съдове с 4 кг смес от почва:пясък (3:1, v:v) за период от 2 месеца. Тримесечните растения бяха подложени на воден дефицит. На 2-ри и 5-ти ден от засушаването бяха взети проби за анализ за проследяване на физиологични и биохимични параметри, както и за съдържание на основни метаболити. Експериментът е проведен в две независими повторения (Схема 1.).

Морфологичните, биохимичните, фитохимичните и физиологичните параметри в настоящото изследване бяха анализирани в проби, изолирани от 28-дневни микроразмножени растения, както и в хода на тяхната *ex vitro* аклиматизация – при оптимална хидратация и съответно на втория и петия ден от подлагането им на засушаване.

3.3. Биохимични и фитохимични изследвания на ензимна антиоксидантна активност и съдържание на антиоксидантни метаболити

3.3.1. Изследване активността на ензимите супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), аскорбат пероксидаза (APX) и гваякол пероксидаза (GPX).

3.3.2. Определяне съдържанието на водоразтворими (WS-AOM) и мастноразтворими (LS-AOM) антиоксидантни метаболити.

3.3.3. Определяне на общо съдържание на феноли и флавоноиди.

3.3.4. Определяне на антирадикалова активност (DPPH метод).

3.3.5. Определяне на фери редуциращата антиоксидантна сила (FRAP метод).

3.3.6. Определяне съдържанието на каротеноиди

3.4. Определяне на разтворими захари

3.5. Определяне съдържанието на стрес маркери

3.5.1. Съдържание на малондиалдехид (MDA)

3.5.2. Съдържание на водороден пероксид (H_2O_2)

3.5.3. Съдържание на свободен пролин

3.5.4. Съдържание на свободни тиолови групи

3.6. Определяне съдържанието на биологично-активни вторични метаболити в *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения.

3.6.1. Определяне на съдържанието на стевиозид и ребаудиозид А

3.6.2. Определяне на съдържание на моно - (CQA) и дикафеоилхинови (DCQA) киселини и кверцетин-3-О-рамнозид (Qu-3-Rha)

3.7. Определяне на водно съдържание (WC) и индекс на мембранна стабилност (IMS)

3.8. Статистическа обработка на данните

4.РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В този раздел са представени експериментални данни, отразяващи влиянието на новосинтезираните аминокиселинни нанофибри, модифицирани със сребърни йони, върху процесите на микроразмножаване, вкореняване и последващ растеж на *Stevia rebaudiana* Bertoni в условия *in vitro*. Проследени са измененията в морфометричните показатели на експлантите в зависимост от приложената концентрация на наноматериала в хранителната среда. Резултатите демонстрират дозозависим ефект както по отношение на преживяемостта и мултипликацията на микропрорастъците, така и при индукцията на коренова система. Експериментът проследява функцията на аминокиселинните нанофибри, носители на сребърни йони като ефективни прайминг агенти, които индуцират физиологична стрес-памет и оптимизират адаптивните механизми на растенията по време на критичния етап на *ex vitro* засушаване.

4.1.а. Влияние на добавянето в MS хранителната среда на ВАР и нанофибри NF-1%Ag, NF-2%Ag (1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹) върху растежа на *S. rebaudiana*

Към момента в научната литература се открояват значителен брой литературни източници относно различното влияние на сребърните наночастици върху растежните характеристики при отделните растителни видове. Добавянето на нановлакна в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹) към MS хранителната среда, образувани от пептидомиметици с нискомолекулно тегло (производни на аминокиселината валин), обогатени с 1% и 2% колоидно сребро (NF-1%Ag, NF-2%Ag), оказва значително влияние върху параметрите, характеризиращи растежа на *in vitro* микроразмножените *S. rebaudiana* (Таблица 1, Фигура 1). Ефективността на органогенезата е 100% за всички изследвани хранителни среди. Сред тестваните концентрации на нановлакната, обогатени с 1% колоидно Ag, най-добри резултати по отношение на свежа биомаса, дължина и брой микропрорастъци за експлант са получени върху MS среда, съдържаща 50 mg L⁻¹ NF-1%Ag. В експеримент на Salama (2012) върху въздействието на сребърните наночастици при обикновен фасул и царевица, данните разкриват, че с увеличаване на концентрацията на

сребърни наночастици, дължината на леторастите и корените се увеличава, и в сравнение с контролните растения значително се увеличава броя на корените. В нашето проучване, третирането с нанофибри, носители на колоидно сребро, индуцира коренообразуването при всички изследвани концентрации. В същото време контролните растения демонстрират пълна липса на коренообразуване (0% вкореняване), което потвърждава ключовата роля на разработените наноструктури за стимулиране на ризогенезис. Концентрация от 50 mg L⁻¹ NF-1% Ag увеличи най-значимо образуването на корени сред избраните концентрации на NF-1% Ag (42,92%), а сред нанофибри, носители на 2% Ag, 50 mg L⁻¹ NF-2% Ag повлия на ризогенезиса с 28,43%. Данните показват, че нанофibrите с по-ниско съдържание на сребро (NF-1% Ag) са по-ефективни за стимулиране на кореновата система при еднаква концентрация от 50 mg L⁻¹. Ниските нива на сребро действат като инхибитор на възприемането на етилена (среброто блокира етиленовите рецептори в клетката). Тъй като етиленът често потиска удължаването на корените, неговото блокиране оказва силно изразен стимулиращ ефект върху ризогенезиса и залагането на латерални коренови меристеми, както и върху растежа на кореновите власинки.

Добавката на нановлакна, обогатени с 2% колоидно Ag при нарастващи концентрации от 1 до 50 mg L⁻¹ значително увеличава дължина на микропрорастъците, натрупването на свежа биомаса и брой микропрорастъци на експлант, в сравнение с двете контроли. Максимално натрупване на свежа биомаса (FW 0,464 g) е отчетено на MS среда, съдържаща 50 mg L⁻¹ NF-2%Ag.

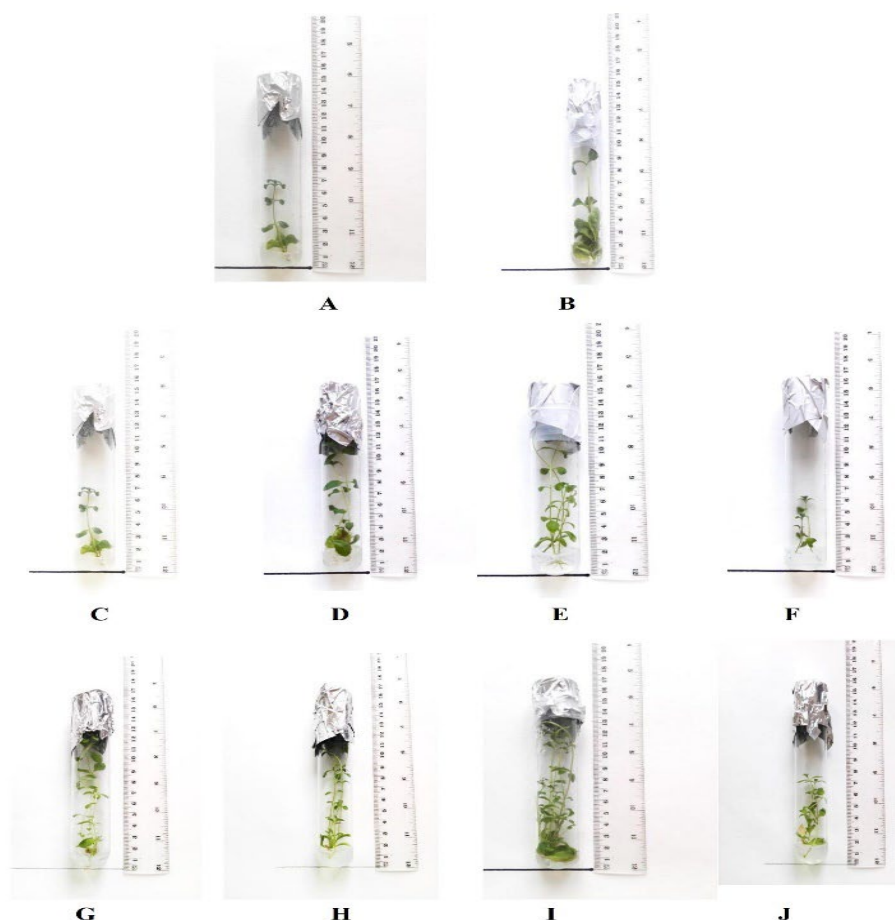
Стойностите на растежните параметри се повишават до 50 mg L⁻¹ NF-1%Ag и NF-2%Ag, а при 100 mg L⁻¹ NF-1%Ag и NF-2%Ag намаляват. Прилагани в по-ниски дози, пептидомиметиците стимулират растежните характеристики на растенията, но при увеличаване на концентрацията растежа се инхибира, което показва наличието на хорметичен ефект (хормезис). В научната литература този феномен често се обяснява с факта, че ниските концентрации на токсични за живата клетка агенти повлияват стимулиращо върху метаболизма, а прекомерно високите им нива на сребърни наночастици могат да предизвикат фитотоксичен ефект или оксидативен стрес, което ограничава потенциала за растеж на тъканите. Този двуфазен отговор вероятно се дължи на превключване на клетъчните сигнали от адаптивна стимулация към активиране на програмирана клетъчна смърт при критични нива на сребърните йони. По този начин

умереното натоварване мобилизира ресурсите на експланта, докато надпраговите дози необратимо увреждат фотосинтетичния и ензимния апарат.

Таблица 1. Морфологични параметри на *in vitro* отгледани растения от *S. rebaudiana*, в MS среда без PGR; в среда, с добавен 1.0 mg L⁻¹ BAP и в среда с добавени NF-1%Ag и NF-2%Ag (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹)

Третиране	FW микропрорастък g ⁻¹	Височина микропрорастък Cm	Брой микропрорастък експлант ⁻¹	Корено образуване %
Контрола (C)	0.12 ± 0.01 ^a	5.97 ± 0.30 ^{ab}	1.01 ± 0.05 ^a	0.04
C + 1.0 mg L ⁻¹ BAP	0.35 ± 0.02 ^{ef}	7.58 ± 0.38 ^e	1.70 ± 0.09 ^d	0.00
1 mg L ⁻¹ NF-1% Ag	0.31 ± 0.02 ^{cd}	6.83 ± 0.34 ^{cd}	1.39 ± 0.07 ^{bc}	15.81
10 mg L ⁻¹ NF-1% Ag	0.33 ± 0.02 ^{de}	7.30 ± 0.36 ^{de}	1.34 ± 0.07 ^{bc}	18.30
50 mg L ⁻¹ NF-1% Ag	0.37 ± 0.02 ^f	8.39 ± 0.42 ^f	1.45 ± 0.07 ^c	42.92
100 mg L ⁻¹ NF-1% Ag	0.29 ± 0.01 ^c	6.58 ± 0.33 ^{bc}	1.40 ± 0.07 ^{bc}	37.12
1 mg L ⁻¹ NF-2% Ag	0.38 ± 0.02 ^f	8.28 ± 0.41 ^f	2.44 ± 0.12 ^e	13.68
10 mg L ⁻¹ NF-2% Ag	0.41 ± 0.02 ^g	8.63 ± 0.43 ^f	3.35 ± 0.17 ^f	17.13
50 mg L ⁻¹ NF-2% Ag	0.46 ± 0.02 ^h	10.79 ± 0.54 ^g	3.25 ± 0.16 ^f	28.43
100 mg L ⁻¹ NF-2% Ag	0.19 ± 0.01 ^b	5.35 ± 0.27 ^a	1.25 ± 0.06 ^b	26.00
LSD	0.03	0.66	0.17	

Стойностите са средни ± SE, n=20; различните букви показват значителни разлики, оценени чрез LSD теста на Fisher ($P \leq 0,05$) след извършване на ANOVA еднофакторен анализ. Използваме буква „a“ за най-ниската стойност на данните и възходящо към следващите букви за по-висока стойност на данните.



Фигура 1. Микропрорастъци от *in vitro* размножена *S. rebaudiana* на MS хранителна среда (A контролни растения); MS среда с добавен 1.0 mg L^{-1} BAP (B); MS среда с добавени нанофибри, синтезирани от производни на аминокиселината валин, носители на 1% колоидно сребро (NF-1%Ag), в концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L^{-1} (C, D, E, F); MS среда с добавени нанофибри, синтезирани от производни на аминокиселината валин, носители на 2% колоидно сребро (NF-2%Ag), в концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L^{-1} (G, H, I, J)

Проучването демонстрира, че интегрирането на наноструктурирани пептидомиметични влакна, модифицирани със сребърни наночастици, ефективно стимулира микроразмножаването, ускорява вегетативното развитие и повишава количеството на свежата растителна биомаса в *in vitro* условия. Този биостимулиращ ефект се дължи на синергичното действие между пептидомиметичната матрица, осигуряваща достъпни органични азотни източници, и контролираното освобождаване на сребърни йони. В резултат на това третираните експлантите развиват по-устойчив фотосинтетичен апарат и демонстрират повишен капацитет за адаптация към последващ осмотичен стрес.

4.1.b. Влияние на добавянето в MS хранителната среда на BAP и нанопибри NF1-Ag salt, NF2-Ag salt (1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹) върху растежа на *S. rebaudiana*

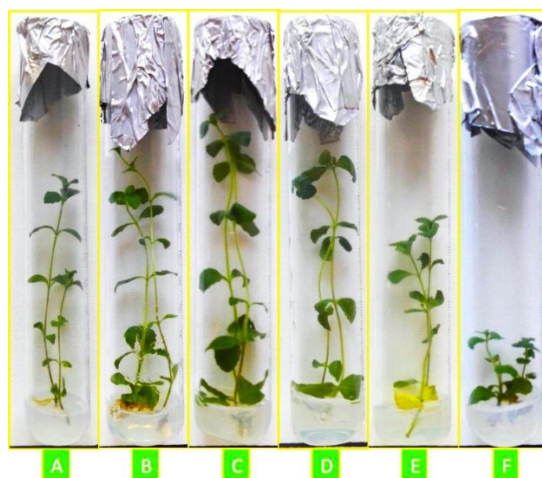
Таблица 2. Морфологични параметри на *in vitro* отгледана *S. rebaudiana* в MS среда без PGR; в среда, с добавен 1 mg L⁻¹ BAP и в среда с добавени нанопибри, в концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹ (NF1-Ag salt)

	MS	MS+BAP	NF1-Ag salt				LSD
		1.0 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	
FW(g) микропро- растък ⁻¹	0.12±0.01 ^a	0.35±0.02 ^d	0.31±0.02 ^c	0.37±0.02 ^{de}	0.39±0.02 ^e	0.24±0.01 ^b	0.03
DW(g) микропро- растък ⁻¹	0.02±0.001 ^a	0.06±0.003 ^c	0.04±0.002 ^b	0.08±0.004 ^e	0.07±0.003 ^d	0.02±0.001 ^a	0.01
височина (cm) микропро- растък ⁻¹	5.97±0.30 ^{bc}	7.58±0.38 ^d	10.14±0.51 ^e	6.39±0.32 ^c	5.48±0.27 ^b	2.01±0.10 ^a	0.60
Брой прорастъци от експлант ⁻¹	1.00±0.05 ^a	1.70±0.09 ^c	1.45±0.07 ^b	1.99±0.1 ^d	3.07±0.15 ^e	1.44±0.07 ^b	0.17
коренообразуване, %	0.00	0.04±0.002 ^a	8.00±0.40 ^c	5.13±0.26 ^b	5.17±0.26 ^b	5.26±0.26 ^b	0.38
брой възли от експлант	2.50±0.13 ^b	4.60±0.23 ^d	3.90±0.20 ^c	5.1±0.26 ^e	4.9±0.25 ^{de}	2.03±0.10 ^a	0.36
средна дължина на междувъзлие	1.50±0.08 ^c	1.64±0.08 ^c	2.60±0.13 ^d	1.25±0.06 ^b	1.08±0.05 ^a	1.01±0.05 ^a	0.14
степен на размножаване PMR	2.50±0.13 ^a	7.82±0.39 ^c	5.66±0.28 ^b	10.15±0.51 ^d	15.04±0.75 ^e	2.92±0.15 ^a	0.76

Стойностите са средни ± SE, n=20; различните букви показват значителни разлики, оценени чрез LSD теста на Fisher ($P \leq 0,05$) след извършване на ANOVA еднопосочен анализ. Използваме буква „a“ за най-ниската стойност на данните и възходящо към следващите букви за по-висока стойност на данните.

Добавянето в култивационната среда на NF1-Ag salt в концентрации от 1 до 50 mg L⁻¹ има благоприятен ефект върху растежа на микропрорастъците от *S. rebaudiana* – отчетено е увеличаване на теглото и на броя на микропрорастъците, спрямо нетретираната контрола (Таблица 2.).

Най-високият процент коренообразуване е регистриран при 1 mg L⁻¹ NF1-Ag salt. Концентрация от 100 mg L⁻¹ на нанопибрите значимо инхибира растежа – намалена височина, тегло, брой прорастъци.



Фигура 2. Микропрорастъци от *in vitro* размножена *S. rebaudiana* на MS хранителна среда (A контролни растения); MS среда с добавен 1 mg L^{-1} BAP (B); MS среда с добавени нанопибри, в концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L^{-1} (C, D, E, F) (NF1-Agsalt)

Добавянето на органични нанопибри, носители на сребърни йони (NF1-Ag salt, NF2-Ag salt) към MS културалната среда, положително повлиява мултиплицирането, дължината на микропрорастъците и иницирането на коренообразуване при *S. rebaudiana*. Димерната сол в много по-голяма степен повлиява иницирането на корени, в сравнение с мономерната, като концентрация от 10 mg L^{-1} NF2-Ag salt повиши процента на коренообразуване до 62,5%. С повишаването на концентрациите на мономерната сол ($1\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$ NF1-Ag salt) се наблюдаваше трикратно увеличаване на свежото тегло на микропрорастъците, в сравнение с контролата, а при последната най-висока концентрация (100 mg L^{-1} NF1-Ag salt) се отчете спад в стойностите на редица морфологични показатели. Оценявайки ефекта на AgNPs в различни концентрации, върху *in vitro* регенерацията на стевия, Castro-González et al. (2019) са наблюдавали значителни разлики в растежните параметри. По-ниските концентрации на AgNPs, добавени в хранителната среда, в най-голяма степен благоприятстват формирането на нови микропрорастъци с най-голяма дължина, а при най-високата концентрация от 200 mg L^{-1} AgNPs в MS средата, са регистрирали най-малък брой нови микропрорастъци с най-малка височина.

Таблица 3. Морфологични параметри на *in vitro* отгледана *S. rebaudiana*, в MS среда без PGR; в среда, с добавен 1 mg L⁻¹ BAP и в среда с добавени нанофибри, в концентрации 1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹ (NF2-Ag salt)

	MS	MS+BAP	1 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	10 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	50 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	100 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	LSD
FW(g) микропрорастък ⁻¹	0.12±0.01 ^b	0.35±0.02 ^d	0.12±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b	0.14±0.01 ^c	0.06±0.003 ^a	0.02
DW(g) микропрорастък ⁻¹	0.018±0.001 ^c	0.058±0.003 ^d	0.013±0.001 ^b	0.015±0.001 ^b	0.014±0.001 ^b	0.009±0.000 ^a	0.002
височина микропрорастък ⁻¹ , cm	5.97±0.30 ^c	7.58±0.38 ^d	6.46±0.32 ^c	5.10±0.26 ^b	4.80±0.24 ^b	2.16±0.11 ^a	0.55
брой прорастъци от експлант ⁻¹	1.00±0.05 ^a	1.70±0.09 ^d	1.40±0.07 ^{bc}	1.39±0.07 ^{bc}	1.49±0.08 ^c	1.30±0.07 ^b	0.12
коренообразуване, %	0.00	0.04±0.002 ^a	37.5±1.88 ^c	62.5±3.13 ^d	34.1±1.71 ^b	40.0±2.0 ^c	3.26
брой възли от експлант	2.5±0.13 ^b	4.6±0.23 ^f	4.25±0.21 ^e	3.85±0.19 ^d	3.45±0.17 ^c	1.59±0.08 ^a	0.31
средна дължина на междувъзлие	1.5±0.85 ^{bc}	1.64±0.08 ^d	1.52±0.08 ^{cd}	1.32±0.09 ^a	1.38±0.07 ^{ab}	1.36±0.07 ^a	0.14
Степен на размножаване (PMR)	2.5±0.12 ^a	7.82±0.39 ^d	5.95±0.30 ^c	5.35±0.27 ^b	5.14±0.26 ^b	2.07±0.11 ^a	0.46

Стойностите са средни ± SE, n=20; различните букви показват значителни разлики, оценени чрез LSD теста на Fisher ($P \leq 0,05$) след извършване на ANOVA еднопосочен анализ. Използваме буква „a“ за най-ниската стойност на данните и възходящо към следващите букви за по-висока стойност на данните.

Органичният матрикс на изследваните нанофибри е синтезиран на базата на производни на аспарагиновата киселина. Може да се допусне, че стимулацията на ризогенезата при добавяне на тези пептидомиметици към средата на Murashige и Skoog (MS) се дължи на екзогенния внос на аминокиселината, която функционира като директно усвоим източник на органичен азот и метаболитен прекурсор за синтеза на протеини в кореновите тъкани. За разлика от неорганичния азот в MS средата (нитрати и амониеви йони), усвояването на готова аминокиселина спестява на растението значителен разход на енергия, който иначе би подпомогнал процесите на нитратна редукция. Тази спестена енергия се инвестира директно в растежа на корена.



Фигура 3. Микропрорастъци от *in vitro* размножена *S. rebaudiana* на MS хранителна среда (A контролни растения); MS среда с добавен 1 mg L^{-1} BAP (B); MS среда с добавени нанопибри, в концентрации $1, 10, 50$ и 100 mg L^{-1} (C, D, E, F) (NF2-Ag salt)

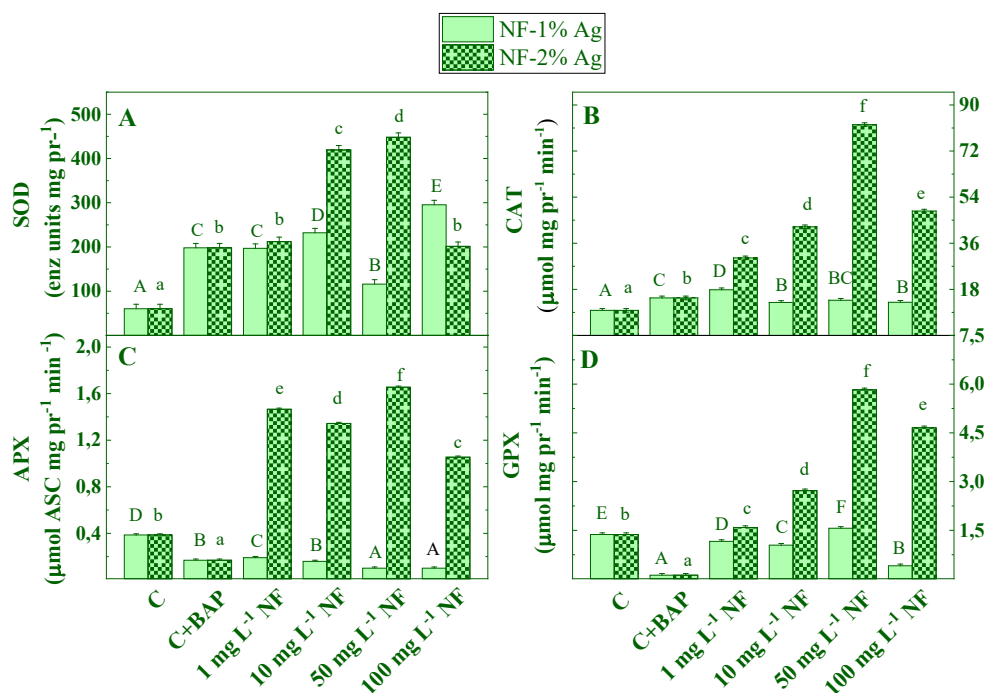
4.2. Антиоксидантна ензимна активност и съдържание на стрес маркери

4.2.1. В микропрорастъци от *S. rebaudiana*, отгледана на MS среда с добавени NF-1%Ag, NF-2%Ag ($1, 10, 50$ и 100 mg L^{-1})

Защитните системи на *Stevia rebaudiana* демонстрират диференциран отговор в зависимост от концентрацията и типа на приложените сребърни нанопибри (AgNFs). Добавянето на NF-1% Ag към хранителната среда не индуцира промени в активностите на аскорбат пероксидазата (APX), каталазата (CAT) и гваякол пероксидазата (GPX), но оказва специфичен стимулиращ ефект върху супероксид дисмутаза (SOD), чиито стойности нарастват сигнификантно във всички варианти спрямо контролата. Обратно, прилагането на NF-2% Ag провокира всеобхватен антиоксидантен отговор, изразен в значително и координирано активиране на целия ензимен комплекс. Този селективен ензимен профил предполага, че по-ниското съдържание на сребро (NF-1% Ag) генерира контролиран физиологичен сигнал (микро-стрес), който активира първата защитна линия (SOD) за дисмутация на супероксидните радикали, докато повишеното съдържание на токсичния

метал при NF-2% Ag надхвърля този праг и налага включването на ROS очистиращите ензими (CAT, APX, GPX) за предотвратяване на настъпващата фитотоксичност.

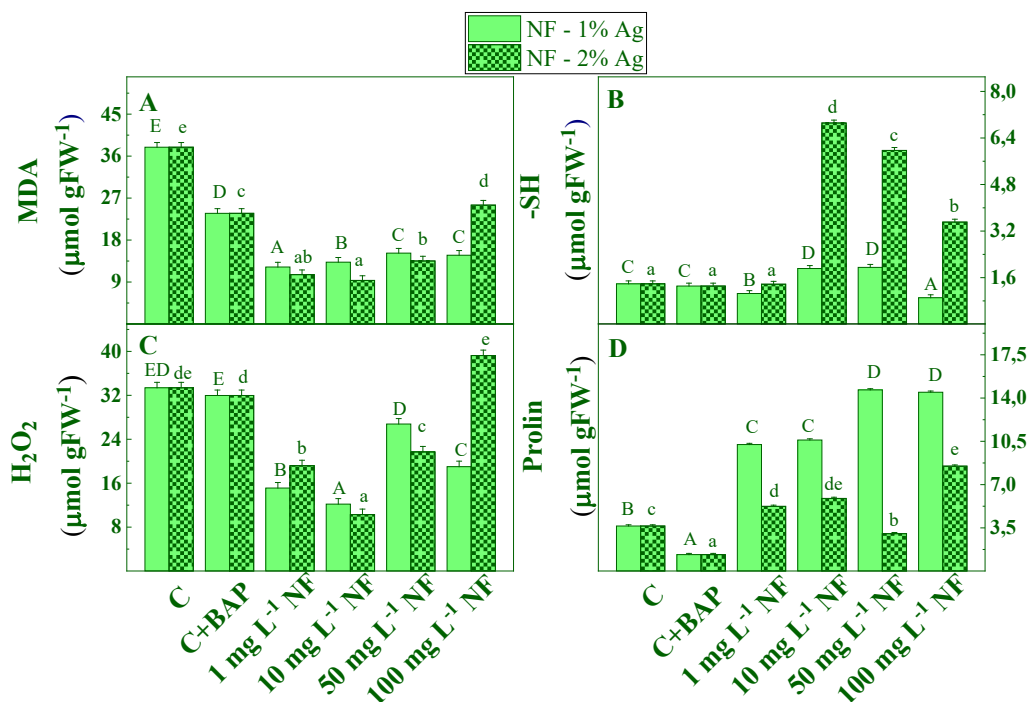
Нивото на антиоксидантната ензимна активност (SOD и CAT) се повишава, когато растенията бяха *in vitro* размножени върху MS хранителна среда, допълнена с BAP, в сравнение с контролните растения, култивирани върху среда без растежен регулатор (Фигура 4.). По отношение на ензимната антиоксидантна активност, по-високи нива на активностите на SOD, CAT, APX и GPX са отчетени в микроразмножени растения *S. rebaudiana*, отгледана върху среда, допълнена с NF-2%Ag, в сравнение с растения, отгледани на MS с NF-1%Ag.



Фигура 4. Активност на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), гваякол пероксидаза (GPX) и аскорбат пероксидаза (APX) в надземната част на *S. rebaudiana*

Ензимната активност нараства прогресивно при повишаване на концентрацията от 1, 10 и 50 mg L⁻¹ NF-2%Ag, докато добавянето на 100 mgL⁻¹ води до намаляване на ензимните активности. Нивата на стрес маркерите като пролин, малондиалдехид (MDA) и водороден пероксид (H₂O₂) намаляват, когато растенията се размножават на MS среда, допълнена с BAP (Фигура 5.). Като цяло, добавянето на NF-1%Ag и NF-2%Ag към MS средата при всички изследвани концентрации води до допълнително намаляване на MDA и H₂O₂ в

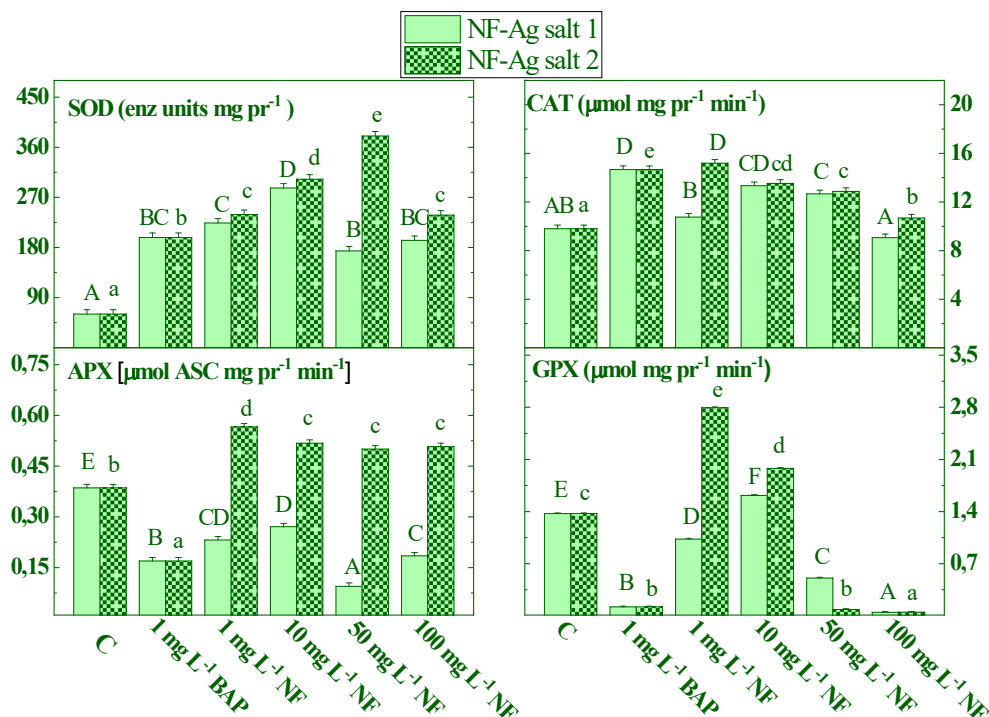
сравнение с контролните нетретираны растения. При 100 mg L^{-1} NF-2%Ag, съдържанието на стрес маркерите драстично се повишава.



Фигура 5. Нива на стрес маркери (MDA, -SH групи, H₂O₂ и пролин) в растенията *S. rebaudiana* размножени *in vitro*

4.2.2. В микропрорастъци от *S. rebaudiana*, отгледана на MS среда с добавени NF1-Ag salt и NF2-Ag salt (1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹)

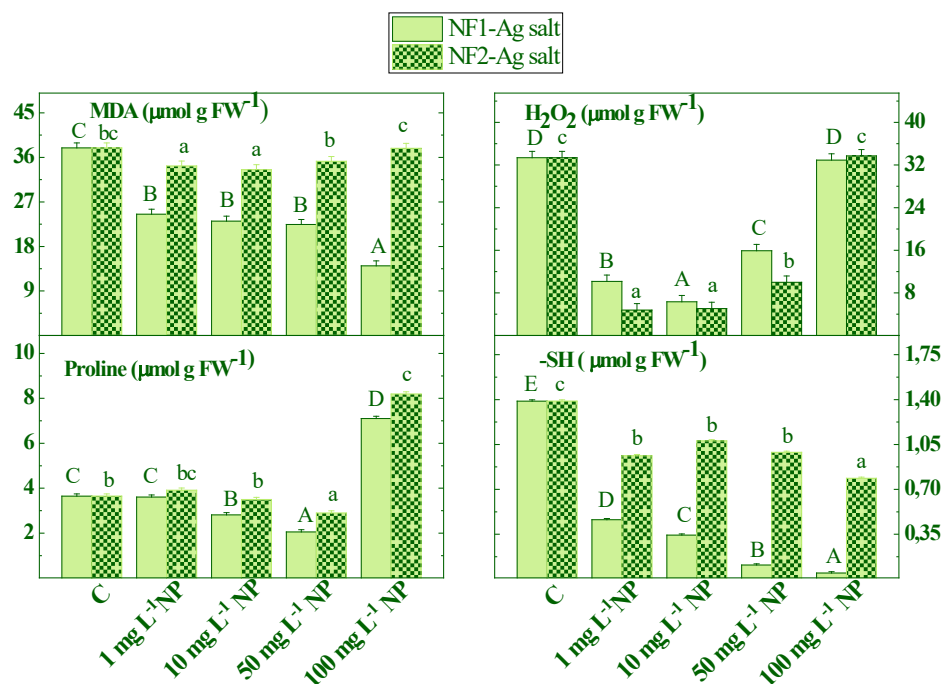
Спрямо нетретираната контрола, активността на SOD, първият ензим, който улавя реактивния кислороден радикал и го превръща във водороден пероксид, се увеличава при добавянето на BAP и нанофибри от 1 до 10 mg L⁻¹ за NF1-Ag salt и до 50 mg L⁻¹ за NF2-Ag salt в хранителната среда, след което намалява (Фигура 6.). Активността на останалите три ензима, които неутрализират H₂O₂ до вода, се увеличава при увеличение на концентрациите на NF1-Ag salt от 1 mg L⁻¹ до 10 mg L⁻¹, а при последващо увеличение на концентрацията на нанофибрите спада. Най-висока измерена активност на каталаза (CAT), гваякол пероксидаза (GPX) и аскорбат пероксидаза (APX) е отчетена при NF2-Ag salt от 1 mg L⁻¹.



Фигура 6. Активност на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), гваякол пероксидаза (GPX) и аскорбат пероксидаза (APX) в надземната част на *S. rebaudiana* размножена *in vitro*

Разликите в промените в активностите на изследваните антиоксидантни ензими в микропрорастъщите стевия под влияние на NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, може да се предположи, че се дължат на удвоеното количество сребърни йони в NF2-Ag salt, в сравнение с NF1-Ag salt.

Обогатяването на културалната среда с NF1-Ag salt в концентрации от 1 до 50 mg L⁻¹ редуцира съдържанието на MDA до нивото на контролните растения, отглеждани на среда с цитокинин BAP, докато най-високата концентрация на тези нанофибри води до допълнително понижаване на показателя (Фигура 7.). Драматично намаление на съдържанието на H₂O₂ в прорастъщите, спрямо това в двете контроли (C и C+BAP), е отчетено при третиране на растенията и с двата изследвани типа нанофибри в концентрации от 1 до 50 mg L⁻¹. С увеличение на концентрацията на наночастиците до 50 mg L⁻¹ NF1-Ag salt и 50 mg L⁻¹ NF2-Ag salt количеството на свободен пролин в прорастъщите от *S. rebaudiana* намалява. При 100 mg L⁻¹ NF1-Ag salt се отчита рязко увеличение на пролина.

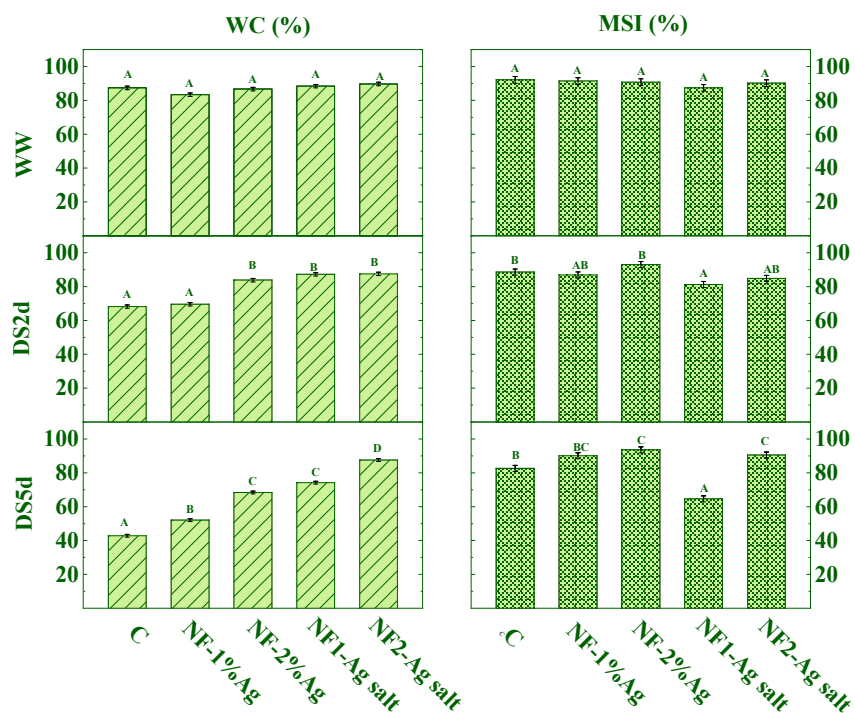


Фигура 7. Нива на стрес маркери (MDA, $-SH$ групи, H_2O_2 и пролин) в микропрорастъците *S. rebaudiana* размножени *in vitro*

Третирането с двата типа нанофибри води до постепенно понижаване на стойностите отчетени за сулфхидрилните групи, с увеличаване на концентрациите на наночастиците, като това понижение е много по-силно изразено във вариантите третиран с NF1-Ag salt.

4.2.3. В листа от *ex vitro* адаптирана на почва и засушена *S. rebaudiana*, размножена на MS среда с добавени аминокиселинни нановлакна (NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt), в концентрация 10 mg L⁻¹.

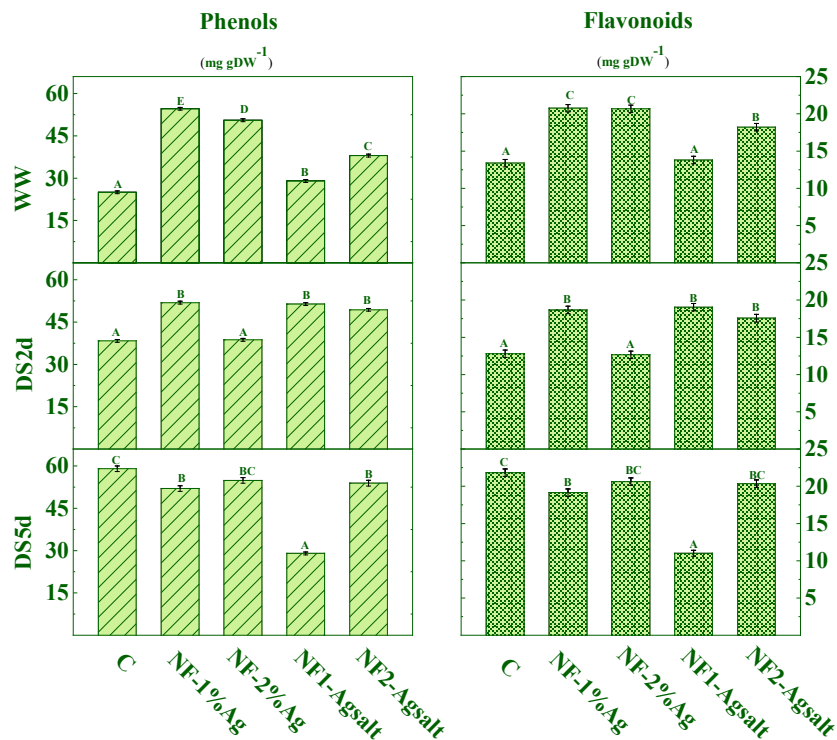
На етапа на добра оводненост, най-високо водно съдържание е измерено в листата на растения, отгледа на MS с добавени на 10 mg L⁻¹ от двата вида сребърни соли (NF1-Ag salt или NF2-Ag salt) (Фигура 8.). При дългосрочното пет дневно засушаване най-големите загуби на вода са наблюдавани отново при контролните растения (42,82%), последвани от тези, предварително третиран с NF-1%Ag и NF-2%Ag. В листата на *S. rebaudiana*, третирана с 10 mg L⁻¹ NF2-Ag salt, WC запази най-високи и стабилни стойности по време на двата етапа на засушаване (87,46%).



Фигура 8. Водно съдържание (WC) и Индекс на мембранна стабилност (MSI) в листа на *S. rebaudiana*, Control и *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L⁻¹ от NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след последваща *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

При добре хидратирани контролни растения е измерен най-висок MSI (92,11%), в сравнение с третираните с четирите добавки растения (91,38% - 87,39%). Вторият ден от засушаване доведе до намаляване стойностите при контролния и третираните варианти. Дългосрочното засушаване на 5-тия ден намали допълнително MSI при нетретираните растения, а увеличаването му е регистрирано при всички третирани варианти, с изключение на този, третиран с NF1-Ag salt.

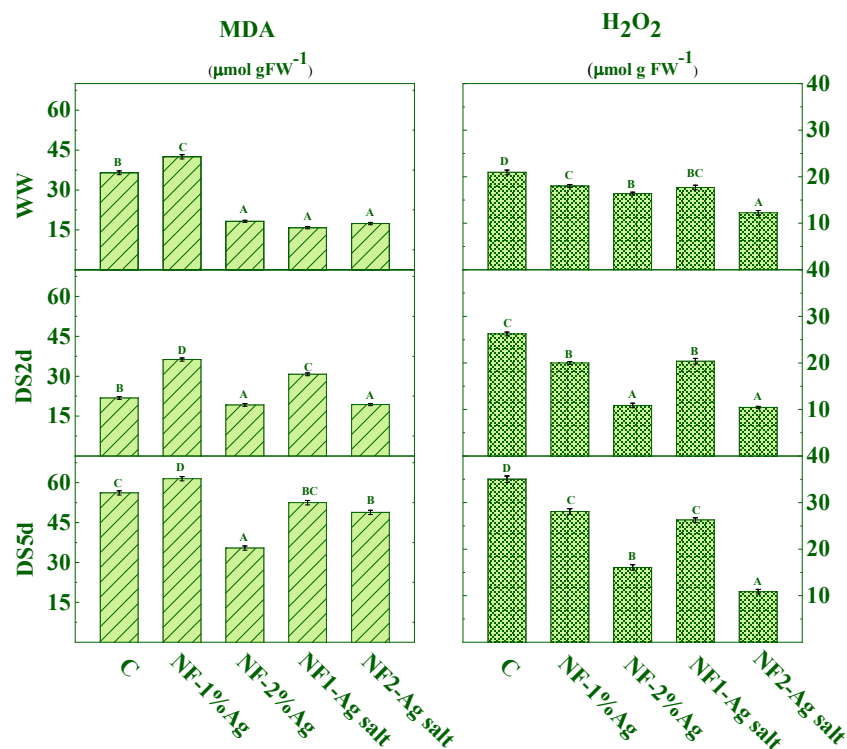
Увеличеното съдържание на общи феноли и флавоноиди в третираната *S. rebaudiana* в оптимални условия допринесе за подобрена толерантност към оксидативния стрес на 2-рия ден от засушаването. В нивата на общите феноли в листата на *S. rebaudiana*, при оптимална почвена влажност, най-ниско съдържание на феноли (25 mg g DW) е регистрирано при *ex vitro* адаптираните растения, размножени *in vitro* на MS хранителна среда, свободна от NFs (Фигура 9.).



Фигура 9. Съдържание на общи фенолни съединения и флавоноиди в надземната част на *S. rebaudiana*, Control и *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L⁻¹ от NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt след последваща *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

След 5 дни на воден дефицит, при третираните с нановлакна и стресирани от суша растения е отчетено по-малко съдържание на феноли и флавоноиди, в сравнение с растенията, които не са третирани с нановлакна. Най-ниско съдържание на феноли и флавоноиди на 5-ия ден от засушаването се наблюдава при растения, предварително третирани с 10 mg L⁻¹ NF1-Ag salt.

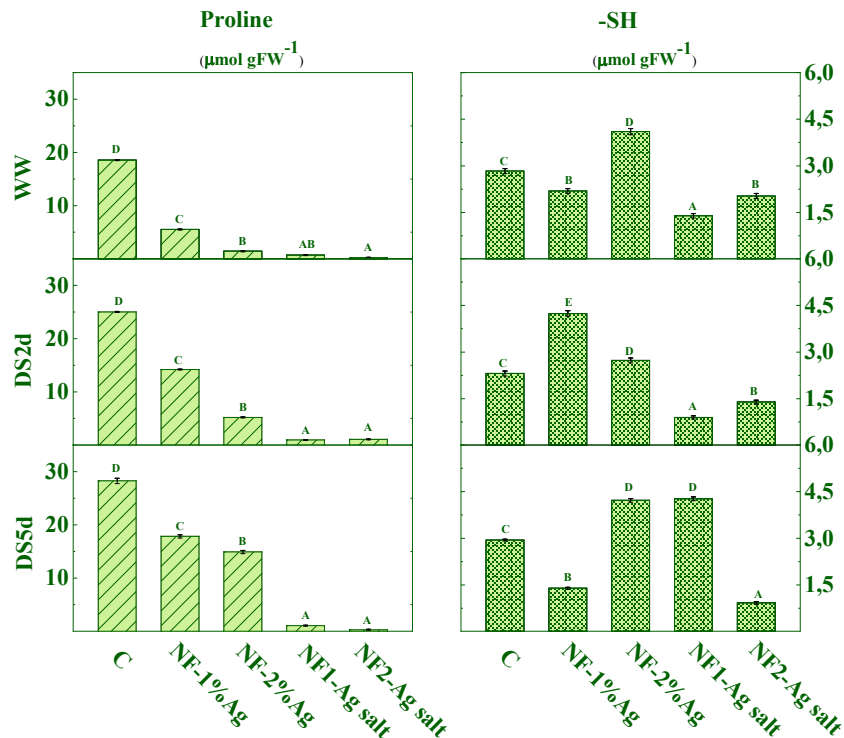
На при WW растения, съдържанието на MDA в *ex vitro* адаптираната *S. rebaudiana* е измерено с най-високи стойности в растения, отгледани на MS среда с 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag, последвани от растенията, отглеждани на среда без добавки (Фигура 10.). На 5-тия ден от засушаването MDA е със статистически значимо увеличение при всички *ex vitro* растения. Съдържанието на H₂O₂ в листата на добре хидратираната *S. rebaudiana* е най-високо при контролния, нетритиран вариант, при който се запазиха доминантни стойностите и през двата етапа на засушаване.



Фигура 10. Съдържание на стрес маркерите MDA и H_2O_2 в надземната част на *S. rebaudiana*, Control и *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L^{-1} от NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след последваща *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

На втория ден от засушаването най-значими намаления на H_2O_2 и най-ниски стойности съответно, са регистрирани при претретирането на растенията с NF-2%Ag и NF2-Ag salt. На петия ден е отчетено повишаване на нивата на H_2O_2 в листата на *S. rebaudiana* при всички варианти, като тенденцията при различните третириания се запази.

В нетретираните растения е наблюдавано допълнително увеличаване количеството на пролин на петия ден от засушаването, а при растенията, третирани с NFs, са регистрирани по-ниски нива на пролин спрямо контролните (Фигура 11.). Дълговременното засушаване води до най-високи стойности на SH- групи в листа на *S. rebaudiana*, претретирана с 10 mg L^{-1} NF-2%Ag и 10 mg L^{-1} NF1-Ag salt.



Фигура 11. Съдържание на стрес маркерите пролин и -SH в надземната част на *S. rebaudiana*, Control и *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L^{-1} от NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след последваща *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

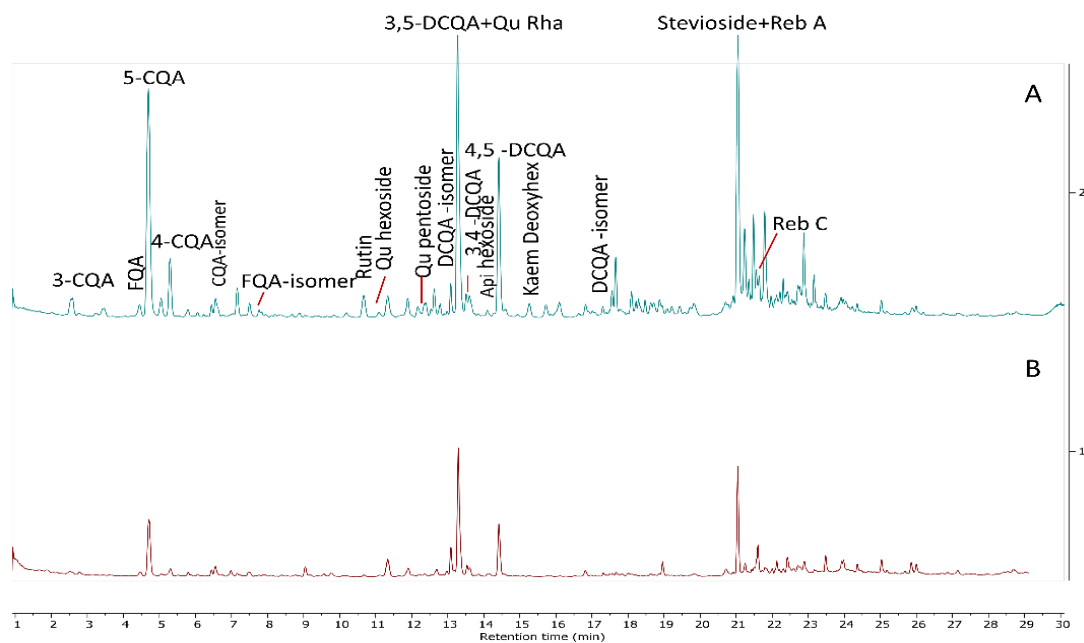
Най-ниско съдържание на пролин и SH- групи на 5-тия ден засушаване е измерено при растения, предварително третирани с 10 mg L^{-1} NF2-Ag salt, което свидетелства за капацитета им да поддържат клетъчния тургур.

4.3. Количествена оценка върху стевиозид, ребаудиозид А, общи захари, моно- (CQA) и дикафеоилхинови (DCQA) киселини и кверцетин-3-О-рамнозид (Qu-3-Rha) под влиянието на нановлакна носители на сребро (NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt) в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L^{-1})

4.3.1. Стевиолови гликозиди и общи захари

Направен е фитохимичен скрининг за съдържание на стевиолови глюкозиди и фенолни съединения в екстракти от конвенционално размножена от семена стевия, от *in vitro* размножена и от *ex vitro* адаптирана микроразмножена на среда с добавени четири типа органични нановлакна носители на сребро (NF-1%Ag и NF-2%Ag, NF1-Ag salt, NF2-Ag salt),

чрез UHPLC-HRMS. Фитохимичният скрининг за съдържание на стевиолови гликозиди в екстрактите показва, че стевиозид и ребаудиозид А са основни компоненти на тези екстракти (Фигура 12.).



Фигура 12. UHPLC-HRMS хроматограма на екстракти от конвенционално размножена от семена стевия (A) и от *in vitro* размножена стевия (B)

Намаление на съдържанието на стевиозид и ребаудиозид А, и увеличаване на съотношението стевиозид/ребаудиозид А е регистрирано в микропрорастъците на *S. rebaudiana*, отгледани в MS среда с BAP, в сравнение с нетретираните контролни растения, докато съдържанието на общите разтворими захари не се променя (Таблица 4.). Най-високото съдържание на стевиозид е отчетено при 100 mg L^{-1} NF-1%Ag. За разлика от нивата на стевиозида, количеството на ребаудиозид А намалява, в сравнение с нетретираните контроли (C), с изключение на варианта с 10 mg L^{-1} NF-1%Ag, но остава по-голямо, отколкото в растенията, отглеждани на MS, съдържащ BAP (C + BAP).

Таблица 4. Съдържание на стевиозид, ребаудиозид А и захари в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, размножена *in vitro* на MS среда, на MS среда с BAP, и на MS среда с добавени в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹) NF-1%Ag и NF-2%Ag

Варианти	стевиозид mg g DW ⁻¹	ребаудиозид А mg g DW ⁻¹	Стевиозид/ ребаудиозид А	захари mg g FW ⁻¹
C	18.611 ± 0.931 ^d	10.474 ± 0.524 ^g	1.777±0.089 ^{bc}	15.250 ± 0.763 ^a
C + BAP	12.401 ± 0.620 ^b	4.018 ± 0.201 ^a	3.086±0.154 ^c	16.020 ± 0.801 ^a
1 mg L ⁻¹ NF-1%Ag	18.297 ± 0.915 ^d	6.802 ± 0.340 ^c	2.690±0.135 ^d	21.890 ± 1.095 ^b
10 mg L ⁻¹ NF-1%Ag	16.515 ± 0.826 ^c	11.600 ± 0.580 ^h	1.424±0.071 ^a	18.280 ± 0.914 ^a
50 mg L ⁻¹ NF-1%Ag	18.021 ± 0.901 ^d	7.015 ± 0.351 ^{cd}	2.569±0.128 ^d	16.070 ± 0.804 ^a
100 mg L ⁻¹ NF-1%Ag	23.464 ± 1.173 ^e	6.133 ± 0.307 ^b	3.826±0.191 ^f	18.680 ± 0.934 ^{ab}
1 mg L ⁻¹ NF-2%Ag	9.048 ± 0.452 ^a	3.580 ± 0.179 ^a	2.527±0.126 ^d	28.540 ± 1.427 ^c
10 mg L ⁻¹ NF-2%Ag	12.316 ± 0.616 ^b	7.537 ± 0.377 ^{de}	1.634±0.082 ^b	49.000 ± 2.450 ^d
50 mg L ⁻¹ NF-2%Ag	11.197 ± 0.560 ^b	7.858 ± 0.393 ^e	1.425±0.071 ^a	53.270 ± 2.664 ^e
100 mg L ⁻¹ NF-2%Ag	17.337 ± 0.867 ^{cd}	9.235 ± 0.462 ^f	1.877±0.094 ^c	94.920 ± 4.746 ^f
LSD	1.384	0.665	0.204	3.508

Третирането с 50 mg L⁻¹ NF2-Ag salt предизвиква най-високо съдържание на стевиозид (11.65 mg g DW⁻¹) сред всички тествани концентрации, но не надвиши нивото на контролите (Таблица 6.). Димерната сол (NF2-Ag salt) води до увеличаване количеството на ребаудиозид А до 4.12 mg g DW⁻¹, но стойностите остават два пъти по-ниски от контролните (10.47 mg g DW⁻¹).

Съдържанието на захари в растенията, третирани с четирите типа наночастици показва значителни разлики (Таблицы 4. и 5.). Най-ниски стойности са отчетени във вариантите с NF2-Ag salt и NF-1%Ag, които са близки до контролните. Добавянето на NF1-Ag salt и NF-2%Ag в MS културалната среда води до значително повишаване на количеството захари в микропрорастъците.

Таблица 5. Съдържание на стевиозид, ребаудиозид А и захари в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, размножена *in vitro* на MS среда; на MS среда с BAP; MS среда с добавени в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹) NF1-Ag salt и NF2-Ag salt.

Варианти	стевиозид mg g DW ⁻¹	ребаудиозид А mg g DW ⁻¹	Стевиозид/ ребаудиозид А	захари mg g FW ⁻¹
C	18.611±0.930 ^f	10.474±0.524 ^h	1.777±0.089 ^b	15.250±0.763 ^b
C + BAP	12.401±0.62 ^e	4.018±0.201 ^g	3.086±0.154 ^{de}	16.020± 0.801 ^b
1 mg L ⁻¹ NF1-Ag salt	3.720±0.186 ^b	2.950±0.148 ^d	1.261±0.063 ^a	64.280±3.214 ^g
10 mg L ⁻¹ NF1-Ag salt	3.630±0.182 ^b	1.930±0.097 ^c	1.881±0.094 ^b	34.810±1.741 ^d
50 mg L ⁻¹ NF1-Ag salt	2.940±0.147 ^{ab}	0.230±0.012 ^a	12.783±0.639 ^f	42.420±2.121 ^f
100 mg L ⁻¹ NF1-Ag salt	2.400±0.120 ^a	1.170±0.059 ^b	2.051±0.103 ^b	39.349±1.968 ^e
1 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	10.250±0.513 ^c	3.580±0.179 ^{ef}	2.863±0.143 ^{cd}	10.763±0.538 ^a
10 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	11.000±0.550 ^{cd}	4.120±0.206 ^g	2.670±0.134 ^c	20.175±1.009 ^c
50 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	11.650±0.583 ^{de}	3.800±0.190 ^{fg}	3.066±0.153 ^{cde}	19.524±0.976 ^c
100 mg L ⁻¹ NF2-Ag salt	10.980±0.549 ^{cd}	3.250±0.163 ^{de}	3.378±0.169 ^e	12.416±0.621 ^a
LSD	0.862	0.376	0.401	2.725

На Таблица 6. е представено съдържанието на стевиозид, ребаудиозид А и захари в надземната част на *Stevia rebaudiana*, *in vitro* размножена върху MS среда и допълнена с 10 mg L⁻¹ от NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване. Количеството на стевиозид и ребаудиозид А в *in vitro* размножените растения е сравнително по-ниско, в сравнение с *ex vitro* адаптираните микроразмножени морфотипове, като общото им съдържание не надвишава 30 mg g⁻¹. Мономерната сол (NF1-Ag salt) на 5-тия ден от засушаването увеличава в най-голяма степен съдържанието на ребаудиозид А сред всички изследвани варианти, а най-ниските му нива са отчетени отново на петдневното засушаване при стевия, *in vitro* размножена на NF2-Ag salt. На 2-рия ден от засушаването, в контролните растения и тези, третирани с NF2-Ag salt, стевиозидът повишава своите стойности.

Таблица 6. Съдържание на стевиозид, ребаудиозид А и захари в надземната част на *ex vitro* адаптирана и засушена *Stevia rebaudiana*

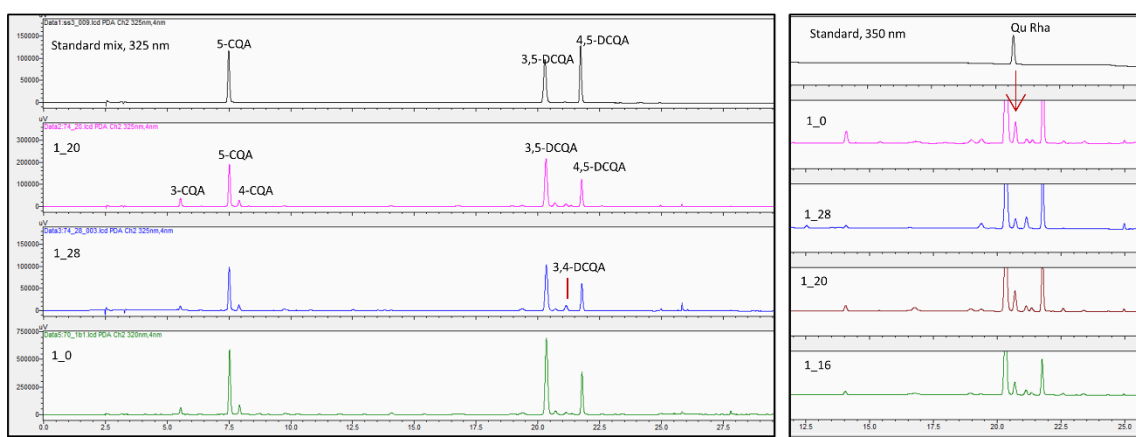
Варианти	стевиозид	ребаудиозид А	Стевиозид/ ребаудиозид А	захари
	mg g DW ⁻¹	mg g DW ⁻¹		mg g FW ⁻¹
<i>C in vitro</i>				
WW	81.71±4.086 ^a	9.45±0.473 ^b	9.647±0.482 ^b	6.2±0.31 ^a
DS2d	83.86±4.193 ^a	6.66±0.333 ^a	12,592±0.63 ^c	7.409±0.37 ^a
DS5d	78.16±3.908 ^a	12.76±0.638 ^c	6.125±0.306 ^a	26.767±1.338 ^b
LSD	8.119	0.993	0.981	1.641
NF-1%Ag, 10 mg L ⁻¹				
WW	89.03±4.452 ^b	5.67±0.284 ^{ab}	15.702±0.785 ^b	10.013±0.501 ^a
DS2d	71.31±3.566 ^a	6.23±0.312 ^b	11.446±0.572 ^a	12.908±0.645 ^b
DS5d	73.72±3.686 ^a	5.12±0.256 ^a	14.398±0.72 ^b	19.766±0.988 ^c
LSD	7.833	0.569	1.395	1.479
NF-2%Ag, 10 mg L ⁻¹				
WW	67.19±3.36 ^b	6.98±0.349 ^a	9.626±0.481 ^c	8.586±0.429 ^b
DS2d	41.93±2.097 ^a	14.24±0.712 ^c	2.945±0.147 ^a	4.756±0.238 ^a
DS5d	81.8±4.09 ^c	10.57±0.529 ^b	7.739±0.387 ^b	21.894±1.095 ^c
LSD	6.567	1.099	0.732	1.384
NF1-Ag salt, 10 mg L ⁻¹				
WW	86.62±4.331 ^b	15.59±0.78 ^b	5.556±0.278 ^b	33.39±1.67 ^b
DS2d	76.39±3.82 ^a	13.14±0.657 ^a	5.814±0.291 ^b	19.93±0.997 ^a
DS5d	78.07±3.904 ^a	23.51±1.176 ^c	3.321±0.166 ^a	18.62±0.931 ^a
LSD	8.258	1.795	0.502	2.487
NF2-Ag salt, 10 mg L ⁻¹				
WW	55.47±2.774 ^a	6.72±0.336 ^b	8.254±0.413 ^b	3.58±0.179 ^a
DS2d	69.08±3.454 ^b	18.2±0.91 ^c	3.796±0.19 ^a	10.922±0.546 ^c
DS5d	57.65±2.883 ^a	4.33±0.217 ^a	13.314±0.666 ^c	8.17±0.409 ^b
LSD	6.096	1.146	0.93	0.813

Засушаването на 5-тия ден увеличи нивото му при всички тествани варианти, с изключение на NF2-Ag salt, в сравнение с краткорочното засушаване, но само при контролните растения и третираните с NF-2% Ag и NF2-Ag salt стойностите му са по-високи от тези на WW етапа.

Най-голямо увеличение (повече от 4 пъти) в съдържанието на захари е регистрирано при контролния вариант между добре хидратирани и засушени растения. Праймингът с NF-1%Ag и NF-2%Ag повиши синтеза на захари съответно 2 пъти и 2,5 пъти на 5-тия ден от засушаването, в сравнение с добре хидратирани растения. Най-високата стойност на захарите е отчетена при третираните с NF1-Ag salt WW растения ($33.39 \text{ mg g FW}^{-1}$). Дългосрочното засушаване намали двойно тяхното съдържание ($18.62 \text{ mg g FW}^{-1}$).

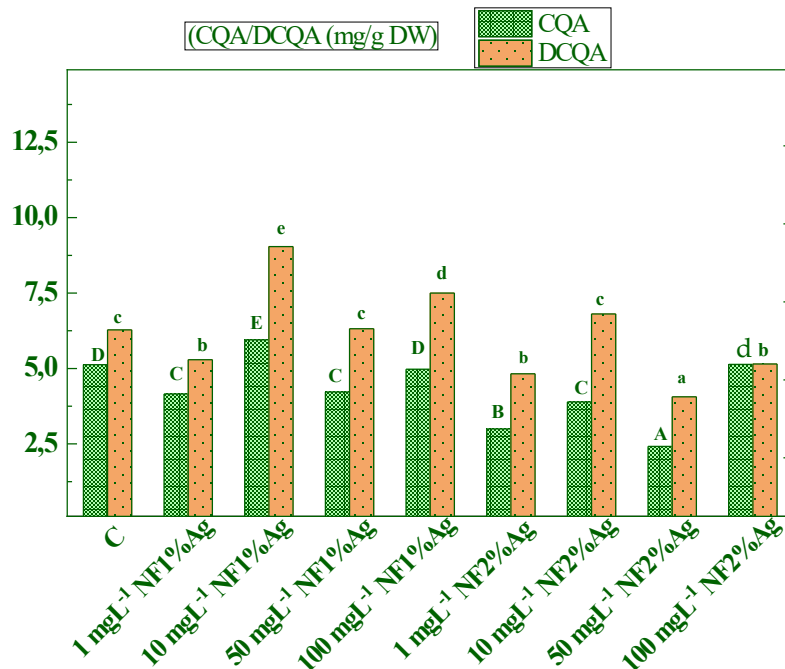
4.3.2. Фенолни съединения

На базата на проведения UHPLC-HRMS анализ бяха подбрани основни фенолни съединения, чието количество да бъде проследено, а именно 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA и 3,4-DCQA, както и на флавоноида Qu-3-Rha (Фигура 13).

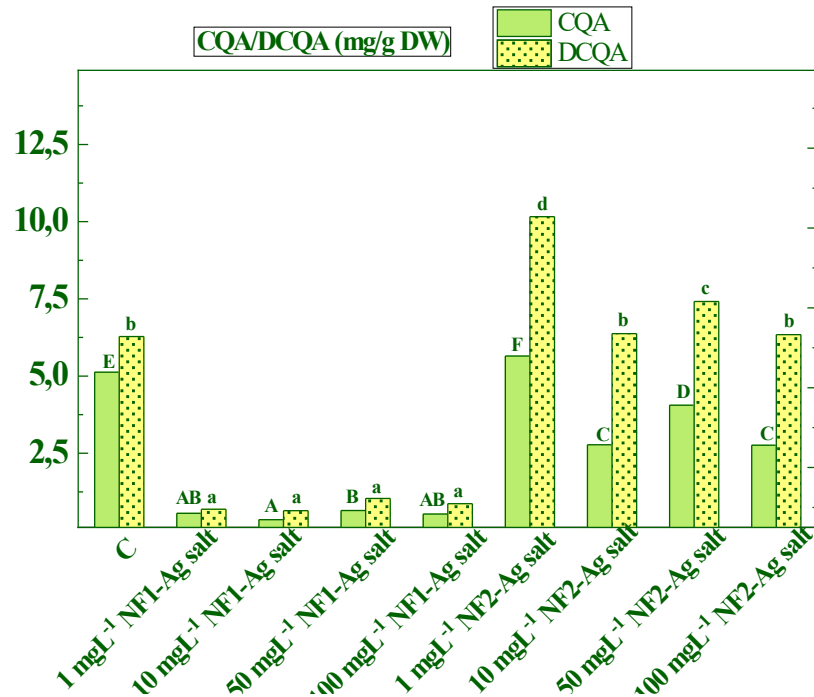


Фигура 13. Хроматограми на стандартна смес от 5-CQA, 3,5-DCQA и 4,5-DCQA при 325 nm (ляво) и на Qu Rha при 350 nm (дясно) и на проби от стевия

Резултатите от количественото определяне на моно- и дикафеоилови естери на хиновата киселина и на кверцетин рамнозид в микропрорастъци от *S. rebaudiana*, размножена *in vitro* са представени на Таблицы 7. и 8. и Фигури 14. и 15. На Фигури 16. и 17. е представено общо съдържание на CQA и DCQA, както и на Qu-3-Rha в листа на *ex vitro* адаптираната и засушена *S. rebaudiana*.



Фигура 14. Общо съдържание на CQA и DCQA в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, размножена *in vitro* на MS среда и на MS среда с добавени в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹) NF-1%Ag и NF-2%Ag



Фигура 15. Общо съдържание на CQA и DCQA в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, размножена *in vitro* на MS среда и на MS среда с добавени в различни концентрации (1, 10, 50, 100 mg L⁻¹) NF1-Ag salt и NF2-Ag salt.

Таблица 7. Съдържание на моно- (CQA) и дикафеоилхинови (DCQA) киселини, и кверцетин-3-О-рамнозид (Qu-3-Rha) (mg/g dried plant material) в микропрорастъци от *S. rebaudiana*, размножена *in vitro*

	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5-DCQA	3,4-DCQA	4,5-DCQA	Qu-3-Rha
<i>C in vitro</i>	0.345±0.017 ^j	4.271±0.214 ^g	0.509±0.025 ⁱ	4.03±0.202 ^e	0.283±0.014 ^d	1.967±0.098 ^g	0.305±0.015 ^f
C+BAP	0.192±0.010 ^e	2.16±0.108 ^{bc}	0.158±0.008 ^d	6.274±0.314 ^g	0.614±0.031 ^j	1.52±0.076 ^d	0.314±0.016 ^f
<i>In vitro</i> NF-1%Ag							
1 g L ⁻¹	0.309±0.015 ⁱ	3.387±0.169 ^e	0.458±0.023 ^h	3.232±0.162 ^{cd}	0.35±0.018 ^e	1.71±0.086 ^{ef}	0.345±0.017 ^{gh}
10 g L ⁻¹	0.304±0.015 ⁱ	5.137±0.257 ⁱ	0.512±0.026 ⁱ	6.279±0.314 ^g	0.466±0.023 ^g	2.295±0.015 ^h	0.344±0.017 ^{gh}
50 g L ⁻¹	0.337±0.017 ^j	3.465±0.173 ^e	0.42±0.021 ^g	4.106±0.205 ^e	0.524±0.026 ^h	1.688±0.084 ^{ef}	0.352±0.018 ^h
100 g L ⁻¹	0.487±0.024 ^l	3.911±0.196 ^f	0.576±0.029 ^j	4.823±0.241 ^f	0.454±0.023 ^g	2.223±0.111 ^h	0.56±0.028 ^k
NF-2%Ag							
1 g L ⁻¹	0.136±0.007 ^c	2.746±0.137 ^d	0.116±0.006 ^c	3.519±0.176 ^d	0.458±0.023 ^g	0.847±0.042 ^b	0.161±0.008 ^d
10 g L ⁻¹	0.245±0.012 ^f	3.307±0.165 ^e	0.342±0.017 ^f	4.629±0.231 ^f	0.518±0.026 ^h	1.662±0.083 ^e	0.252±0.013 ^e
50 g L ⁻¹	0.211±0.011 ^e	1.94±0.097 ^b	0.265±0.013 ^e	2.528±0.126 ^b	0.28±0.014 ^d	1.252±0.063 ^c	0.169±0.008 ^d
100 g L ⁻¹	0.375±0.019 ^k	4.044±0.202 ^{fg}	0.715±0.036 ^k	2.985±0.149 ^c	0.344±0.017 ^e	1.82±0.091 ^f	0.295±0.015 ^f
NF1-Ag salt							
1 g L ⁻¹	0.058±0.003 ^{ab}	0.4±0.02 ^a	0.098±0.005 ^c	0.342±0.017 ^a	0.073±0.004 ^a	0.276±0.014 ^a	0.095±0.005 ^{bc}
10 g L ⁻¹	0.041±0.002 ^{ab}	0.255±0.013 ^a	0.055±0.003 ^{ab}	0.323±0.016 ^a	0.113±0.006 ^b	0.207±0.010 ^a	0.083±0.004 ^{ab}
50 g L ⁻¹	0.06±0.003 ^b	0.504±0.025 ^a	0.084±0.004 ^{bc}	0.48±0.024 ^a	0.259±0.013 ^d	0.298±0.015 ^a	0.112±0.006 ^c
100 g L ⁻¹	0.039±0.002 ^a	0.459±0.023 ^a	0.034±0.002 ^a	0.504±0.025 ^a	0.193±0.010 ^c	0.171±0.009 ^a	0.064±0.003 ^a
NF2-Ag salt							
1 g L ⁻¹	0.27±0.014 ^h	4.8±0.24 ^h	0.58±0.029 ^j	6.835±0.342 ^h	0.566±0.028 ⁱ	2.761±0.138 ⁱ	0.614±0.031 ^l
10 g L ⁻¹	0.154±0.008 ^{cd}	2.23±0.112 ^c	0.393±0.02 ^g	4.125±0.206 ^e	0.434±0.022 ^g	1.814±0.091 ^f	0.432±0.022 ⁱ
50 g L ⁻¹	0.265±0.013 ^{gh}	3.257±0.163 ^e	0.534±0.027 ⁱ	4.801±0.24 ^f	0.444±0.022 ^g	2.171±0.109 ^h	0.501±0.025 ^j
100 g L ⁻¹	0.167±0.008 ^d	2.332±0.117 ^c	0.262±0.013 ^e	4.173±0.209 ^e	0.4±0.020 ^f	1.77±0.089 ^{ef}	0.318±0.016 ^{fg}
LSD	0.021	0.256	0.033	0.338	0.033	0.137	0.028

Стойностите са средни ± SE, n=20; различните букви показват значителни разлики, оценени чрез LSD теста на Fisher (P≤0,05) след извършване на ANOVA еднопосочен анализ. Използваме буква „a“ за най-ниската стойност на данните и възходящо към следващите букви за по-висока стойност на данните.

Кафеоилхиновите киселини (CQAs) са сред най-разпространените полифеноли и техните производни 3-CQA, 4-CQA и 5-CQA са застъпени в редица растителни видове. При микропрорастъците на *S. rebaudiana*, отгледана при 100 mg L⁻¹ NF-1%Ag и 100 mg L⁻¹ NF-2%Ag беше регистрирано увеличение на 3-CQA, а при 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag беше повишен синтеза на 5-CQA (Таблица 7.). Най-високо общо съдържание на монокафеоилхинови киселини (28.29 mg g⁻¹) е при *ex vitro* растения, отгледани на среда без добавки, на 5-тия ден от засушаване (Фигура 16.).

Сред дикафеоилхиновите киселини, 3,5-DCQA е основен компонент с най-ниско съдържание в микропрорастъци, отгледани с 10 mg L⁻¹ NF1-Ag salt (0.32 mg g⁻¹) и най-високо – в микропрорастъци отгледани с 1 mg L⁻¹ NF2-Ag salt, (6.8 mg g⁻¹), следвана от 4,5-DCQA (0.17 и 2.3 mg g⁻¹ в микропрорастъци, отгледани с 10 mg L⁻¹ NF-2%Ag и 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag) и 3,4-DCQA (0.073 и 0.61 mg g⁻¹ в микропрорастъци отгледани с 1 mg L⁻¹ NF1-Ag salt и микропрорастъци отгледани с ВАР) (Таблица 7.). Най-високо съдържание на общи дикафеоилхинови киселини при дългосрочното засушаване е при растения, отглеждани на среда с NF1-Ag salt (Фигура 16.). Кверцетинът (Qu-3-Rha), биоактивно природно съединение, подклас на флавоноидите, участва в редица физиологични процеси в растенията и като мощен антиоксидант осигурява толерантност към биотичен и абиотичен стрес. Количеството на кверцетин рамнозид е сравнително ниско и варира в стойности от 0.083 до 0.614 mg g⁻¹ в микропрорастъци, отгледани с 10 mg L⁻¹ NF1-Ag salt и микропрорастъци, отгледани с 1 mg L⁻¹ NF2-Ag salt, съответно (Таблица 7.). При добре хидратирани, *ex vitro* размножени и третирани с NF-1%Ag растения са отчетени най-високите стойности на кверцетин рамнозид (3.95 mg g⁻¹) (Фигура 17.).

Като цяло, микропрорастъците, отгледани с NF1-Ag salt и в четирите тествани концентрации са най-бедни на естери на хиновата киселина и на кверцетин рамнозид. Третирането с ВАР увеличи съдържанието на някои дикафеоилхинови киселини, но доведе до приблизително два пъти по-нисък синтез на кафеоилхиновите киселини. 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag и 1 mg L⁻¹ NF2-Ag salt повлияват най-благоприятно върху производството на полифеноли при микроразмножената стевия и увеличават в най-голяма степен нивата им спрямо контролата.

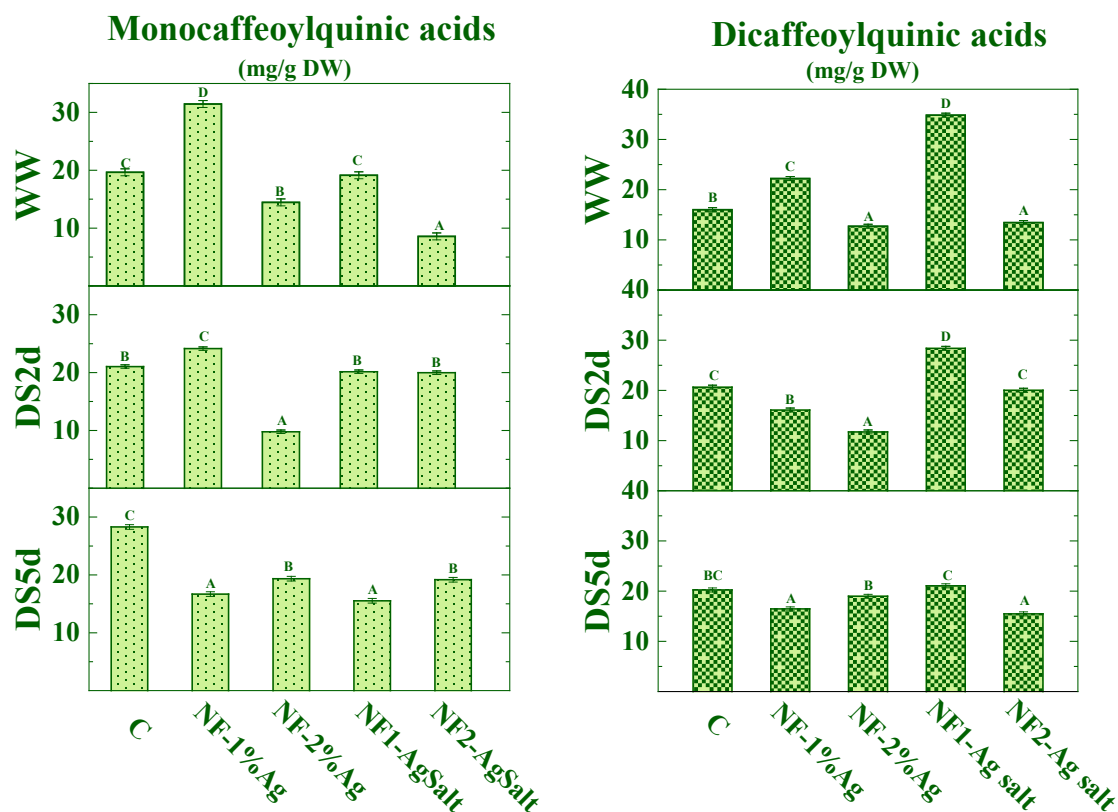
Таблица 8. Съдържание на моно - (CQA) и дикафеоилхинови (DCQA) киселини и кверцетин-3-О-рамнозид (Qu-3-Rha) (mg/g DW раст. м-л) в *S. rebaudiana*, *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5-DCQA	4,5-DCQA	Qu-3-Rha
WW plants						
<i>C in vitro</i>	4.08±0.204 ^c	12.32±0.616 ^c	3.25±0.163 ^c	10.59±0.53 ^a	5.42±0.271 ^c	2.38±0.119 ^a
NF-1%Ag	7.1±0.355 ^d	19.59±0.98 ^d	4.77±0.239 ^d	15.69±0.785 ^b	6.54±0.327 ^d	3.95±0.198 ^d
NF-2%Ag	2.5±0.125 ^b	10.27±0.514 ^b	1.68±0.084 ^b	9.62±0.481 ^a	3.11±0.156 ^a	2.52±0.126 ^a
NF1-Ag salt	2.76±0.138 ^b	13.35±0.668 ^c	3.02±0.151 ^c	21.62±1.081 ^c	13.21±0.661 ^c	2.86±0.143 ^b
NF2-Ag salt	1.51±0.076 ^a	6.15±0.308 ^a	0.92±0.046 ^a	9.61±0.481 ^a	3.83±0.192 ^b	3.14±0.157 ^c
LSD	0.371	1.191	0.276	1.293	0.67	0.275
2d drought						
<i>C in vitro</i>	4.5±0.225 ^d	13.06±0.653 ^b	3.48±0.174 ^c	13.81±0.691 ^c	6.84±0.342 ^c	2.77±0.139 ^c
NF-1%Ag	5.81±0.291 ^e	14.22±0.711 ^b	4.11±0.206 ^d	10.53±0.527 ^b	5.56±0.278 ^b	2.74±0.137 ^c
NF-2%Ag	0.63±0.032 ^a	7.91±0.396 ^a	1.23±0.062 ^a	8.08±0.404 ^a	3.66±0.183 ^a	1.7±0.085 ^a
NF1-Ag salt	3.72±0.186 ^c	13.78±0.689 ^b	2.65±0.133 ^b	19.54±0.977 ^d	8.84±0.442 ^d	2.75±0.138 ^c
NF2-Ag salt	1.81±0.091 ^b	15.73±0.787 ^c	2.44±0.122 ^b	14.22±0.711 ^c	5.81±0.291 ^b	2.41±0.121 ^b
LSD	0.344	1.202	0.268	1.254	0.58	0.228
5d drought						
<i>C in vitro</i>	4.83±0.242 ^d	19.43±0.972 ^c	4.03±0.202 ^d	13.99±0.7 ^b	6.24±0.312 ^{bc}	2.45±0.123 ^a
NF-1%Ag	4.05±0.203 ^c	9.43±0.472 ^a	3.21±0.161 ^c	9.73±0.487 ^a	6.73±0.337 ^c	2.84±0.142 ^b
NF-2%Ag	3.84±0.192 ^c	12.68±0.634 ^b	2.83±0.142 ^b	13.46±0.723 ^b	5.52±0.276 ^a	2.82±0.141 ^b
NF1-Ag salt	2.03±0.102 ^a	11.75±0.588 ^b	1.75±0.088 ^a	15.08±0.754 ^b	5.98±0.299 ^{ab}	2.65±0.133 ^{ab}
NF2-Ag salt	3.34±0.167 ^b	12.87±0.644 ^b	2.96±0.148 ^{bc}	10.03±0.502 ^a	5.45±0.273 ^a	2.86±0.143 ^b
LSD	0.340	1.241	0.277	1.17	0.546	0.245

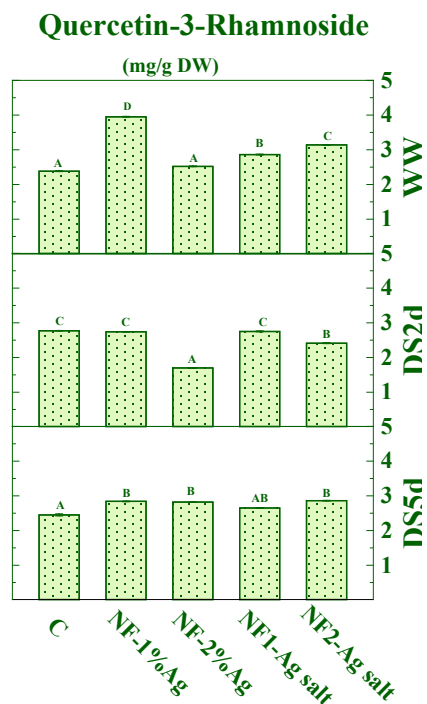
Стойностите са средни ± SE, n=20; различните букви показват значителни разлики, оценени чрез LSD теста на Fisher (P≤0,05) след извършване на ANOVA еднопосочен анализ. Използваме буква „a“ за най-ниската стойност на данните и възходящо към следващите букви за по-висока стойност на данните.

Засушаването, като основен ограничаващ фактор при растенията, оказва значително въздействие върху растежа им и променя не само тяхната анатомия и физиология, но води

и до колебания в състава на вторичните им метаболити. Стресът от засушаване повлия на цялостната биосинтеза, разпределение и натрупване на БАВМ в растителните тъкани и органи на *S. rebaudiana*. Редица изследвания илюстрират, че полифенолите, в частност кафеоилхиновите киселини, функционират като антиоксиданти, улавящи кислородни радикали, за да смекчат индуцираните от различни видове стрес клетъчни увреждания. Повишеният им синтез в нашия експеримент в нетретираните и засушени *S. rebaudiana* е доказателство за нарушения във вътреклетъчния баланс, вследствие на прекомерно производство на реактивни кислородни видове в резултат на засушаването. В условия на засушаване, занижените стойности на метаболити, елиминиращи ROS, са аргумент в полза на третирането с AgNPs, които предизвикват индукция на специализирани биомолекули при първоначален стрес, и съдействат на клетъчно ниво в метаболитния отговор при последващ стрес.



Фигура 16. Общо съдържание на CQA и DCQA в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване



Фигура 17. Общо съдържание на кверцетин-3-О-рамнозид (Qu-3-Rha) в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana*, *in vitro* размножена върху MS среда, допълнена с 10 mg L⁻¹ NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt, след *ex vitro* адаптация и подлагане на 2- (DS2d) и 5- (DS5d) дневен период на засушаване

Получените в настоящото изследване резултати и повдигнатите научно-приложни въпроси очертават перспективна основа за бъдещи интердисциплинарни проучвания. Експерименталните данни потвърждават, че екзогенното приложение на модифицираните със сребърни йони органични нанوفибри в хранителната среда за *in vitro* култивиране на стевия (*Stevia rebaudiana*) оказва системно влияние върху растителния организъм. Въвеждането им в култивиращата среда по време на *in vitro* етапа оптимизира вегетативния растеж на експлантите и същевременно действа с елиситорен ефект, който активира ензимната защита на микропрорастъците още преди излагането им на външни стресови фактори и пренастройва клетъчния метаболизъм, подготвяйки растителния организъм за успешна последваща адаптация. Бъдещите изследвания следва да се фокусират върху фината регулация на антиоксидантните системи и потенциала на тези наноструктури за запазване на клетъчната хомеостаза и метаболитния баланс при воден дефицит.

ИЗВОДИ

1. Третирането с NF-2%Ag индуцира по-висока растежна активност, активира ензимната антиоксидантна защита (SOD, CAT, APX, GPX) и понижава стрес маркерите MDA и пролин спрямо NF-1%Ag. Коренообразуването е по-добро при NF-1%Ag в сравнение с NF-2%Ag. От четирите изследвани вариации на NF-1%Ag и NF-2%Ag, единствено 100 mg L⁻¹ NF-1%Ag индуцира статистически значимо повишение в съдържанието на стевиозид и флавоноида кверцетин-3-рамнозид.
2. В микропрорастъци на *S. rebaudiana*, третирана с NF1-Ag salt е отчетен по-голям ефект върху растежа на растенията и по-ниско съдържание на стрес маркерите MDA и пролин, спрямо NF2-Ag salt. Коренообразуването е по-добро при NF2-Ag salt в сравнение с NF1-Ag salt. Двата вида соли (NF1-Ag salt и NF2-Ag salt) намаляват биосинтеза на стевиоловите гликозиди.
3. Растежните параметри демонстрират възходяща тенденция в диапазона от 1 до 50 mg L⁻¹, последвана от инхибиране при доза от 100 mg L⁻¹ за всички изследвани нанофибри. Описаната линейна зависимост има бифазен характер и е доказателство за проявата на хормезис (хорметичен ефект).
4. Разкрита е строго отрицателна зависимост (обратна корелация) между акумулацията на дитерпеновите гликозиди (стевиозид и ребаудиозид А) и вегетативните растежни параметри при микропрорастъци от *S. rebaudiana*.
5. Претретирането с 10 mg L⁻¹ NF-Ag действа като ефективен цитопротектор при *S. rebaudiana* в условия на засушаване, като намалява окислителния стрес и стабилизира мембраните (повишени WC и MSI; понижени H₂O₂, MDA, пролин, захари и антиоксидантен капацитет). По-високата концентрация (NF-2%Ag) оказва по-силен защитен ефект, което я прави по-ефективна при воден дефицит.
6. Претретирането с NF-Ag соли повишава устойчивостта на *S. rebaudiana* при воден дефицит, като съхранява водното съдържание в листата и минимизира стрес маркерите (MDA, H₂O₂) спрямо контролата. Формулата NF2-Ag демонстрира по-висока ефективност от NF1-Ag, осигурявайки стабилен мембранен индекс (MSI) и най-ниски нива на стрес сред всички тествани NF.

ПРИНОСИ

1. Разработен е иновативен биотехнологичен подход за целенасочено регулиране на биомасата, морфогенезата и антиоксидантния капацитет при *in vitro* култивирана *S. rebaudiana*. Методът се базира на екзогенно модифициране на хранителната среда на MS чрез въвеждане на различни концентрации (1, 10, 50 и 100 mg L⁻¹) на два типа нанوفибри: органични нановлакна от валинови пептидомиметици, носители на 1% и 2% колоидно сребро (NF-1%Ag и NF-2%Ag), и нанوفибри от соли на аспарагинови производни (NF1-Ag salt и NF2-Ag salt).

2. Установен е иновативен биотехнологичен подход за оптимизиране на *ex vitro* аклиматизацията на *S. rebaudiana* чрез контролирано стимулиране на ризогенезата в условия на *in vitro* култивиране. Доказано е, че модификацията 10 mg L⁻¹ NF2-Ag salt индуцира максимален интензитет на коренообразуване, който гарантира успешното вкореняване и по-висок процент на оцеляване при последващия етап на адаптация на растенията..

3. За първи път е извършено комплексно проучване върху ефекта от предварително третиране с нанوفибри (NF-1%Ag, NF-2%Ag, NF1-Ag salt и NF2-Ag salt) и последващата *ex vitro* адаптация на *S. rebaudiana*, подложена на вариабилен воден режим (оптимална почвена влажност, кратковременно 2-дневно и продължително 5-дневно засушаване). Проследена е динамиката на параметрите, характеризиращи морфологичния и физиологичния статус, ензимната и неензимната антиоксидантна активност, както и количествените изменения в съдържанието на стевиол гликозиди, общи разтворими захари, моно- (CQA) и дикафеоилхинови (DCQA) киселини и кверцетин-3-рамнозид (Qu-3-Rha).

4. Установен е нов механизъм на нано-медирана водна хомеостаза при *S. rebaudiana* в условия на воден дефицит, при който претретирането с AgNFs осигурява по-добра водна хомеостаза в условия на засушаване, свързана с по-добър антиоксидантен защитен механизъм, водещ до по-ниски нива на ROS, стрес маркери и осмопротектори и по-ниска степен на активиране на антиоксидантни метаболити в праймираните растения. (с научно-теоретичен характер)

5. Разработен е иновативен подход за биотехнологично праймиране на *S. rebaudiana* с AgNFs, който значително повишава преживяемостта и физиологичната устойчивост чрез

стабилизиране на водното съдържание в листата. Разкрита е важна метаболитна зависимост с пряко икономическо значение: предпазването на вегетативната биомаса от увяхване чрез AgNFs е свързано с репресия на биосинтеза на целевите търговски метаболити (сладките гликозиди). Констатираното противоречие между биологичния ефект и икономическата ефективност на метода е спасяването на посевите от физиологично загиване за сметка на намалена пазарна стойност на реколтата. (с научно-приложен характер)

ПУБЛИКАЦИИ

Sichanova M, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova E, Nedev T, Tsekova D, Iwanov I, Dochev K, Ivanova V, Trendafilova T. Improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* propagation and steviol glycoside content using aminoacid silver nanofibers. *Plants*. 2022; 11(19):2468. SJR (Scopus):0.765, JCR-IF (Web of Science):4.658 - Q1 <https://doi.org/10.3390/plants11192468>

Sichanova M, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova E, Nedev T, Tsekova D, Ivanova V, Trendafilova A. Influence of the abiotic elicitors Ag salts of aspartic acid derivatives, self-organized in nanofibers with monomeric and dimeric molecular structures, on the antioxidant activity and stevioside content in micropropagated *Stevia rebaudiana* Bert. *Plants*. 2023; 12:3574. JCR-IF (Web of Science):4.5 - Q1 <https://doi.org/10.3390/plants12203574>

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Постери:

1. **Sichanova M**; Miladinova-Georgieva K; Petrova M; Kirova M; Tsecova D, Geneva M. Evaluation of the antioxidant activity of micropropagated stevia affected by peptidomimetic nanofibers as an Ag carrier. The 11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPEEC), October 6th - 10th, 2022, Ohrid, Republic of North Macedonia
2. **Sichanova M**, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Tsekova D, Ivanova V, Trendafilova A, Influence of Ag salts of aspartic acid derivatives, self-organized in nanofibers with monomeric molecular structures, on the micropropagation and mono- (CQA), and dicaffeoylquinic (DCQA) acids content in *Stevia rebaudiana* Bert., Satellite Scientific Symposium "Medicinal and Aromatic Plants for Innovative Bioactive Products", 10 November 2023, Sofia, Bulgaria
3. **Sichanova M**, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova K, Tsekova D, Effect of silver nanofibers on non-enzymatic antioxidant defense in *Stevia rebaudiana* subjected to drought. 12th Central European Conference on Food 2024, 13-16 October 2024, Szeged, Hungary
4. **Sichanova M**, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Tsekova D, Effect of organic nanofibers carrying auxin on morphology and non-enzymatic antioxidant defense in *Stevia rebaudiana* under *in vitro* conditions, Plant Biology Europe 2025 congress (PBE 2025) Budapest, Hungary, 25 - 28 June 2025
5. **Sichanova M**, Geneva M, Miladinova-Georgieva K, Zayova E, Tsekova D, Metabolic changes in *in vitro* propagated *Stevia rebaudiana* in response to creatine-lysinate complex, added to MS medium, 18th Scientific Conference of the Bulgarian Focal Point of EFSA with international participation, Sofia, Bulgaria, 14.05.2026

Доклади:

1. **Сичанова М**, Генева М, Петрова М, Миладинова-Георгиева К, Цекова Д, Влияние на аминокиселинни нанопибри, носители на сребро, върху *in vitro* размножаването и натрупването на вторични метаболити в *Stevia rebaudiana* Bert, 6ти Интердисциплинарен докторантски форум, 13 – 16 Май 2025 г., Велинград, България.
2. **Сичанова М**. Антиоксидантна активност и натрупване на вторични метаболити в микропрорастъци от *Stevia rebaudiana* Bertoni, *in vitro* размножени на среда с добавени аминокиселинни нанопибри, носители на сребро. Представяне на изследователски направления "Биохимия" и "Физиология на растенията" в ИФРГ-БАН, 27.11.2025
3. **Сичанова М**. *In vitro* размножаване на *Stevia rebaudiana* чрез прилагане на аминокиселинни нанопибри и влияние на засушаването върху *ex vitro* адаптираните растения. Представяне на готовите резултати пред Открито заседание – Семинар на Лаборатория „Растително-почвени взаимодействия“, ИФРГ-БАН, 03.12.2024

СПИСЪК НА ЗАБЕЛЯЗАНИТЕ ЦИТИРАНИЯ

Статия: 1. Sichanova M, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova E, Nedev T, Tsekova D, Iwanov I, Dochev K, Ivanova V, Trendafilova T. Improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* propagation and steviol glycoside content using aminoacid silver nanofibers. *Plants*. 2022; 11(19):2468. - Q1 <https://doi.org/10.3390/plants11192468>

Цитирана от:

1. Sharma S, Gupta S, Kumari D, Lal Kothari S, Jain R, Kachhwaha S, 2023, Exploring plant tissue culture and steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: A Review, *Agriculture* 13(2):475
2. Sharma S, Gupta S, Jain R, Kothari S L, Kachhwaha S, 2023, SiO₂ nanoparticles as elicitor for increased rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* micropropagated in solid and liquid cultures: a comparative study, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155, 541–552
3. Şahin G, 2023, Effects of nitric oxide, spermidine, and salicylic acid signaling and their crosstalk with each other in the production of commercially important stevioside content and drought stress responses in *Stevia rebaudiana* bertoni". *Biotech Studies* 32(2): 65-74
4. Ptak A, Szewczyk A, Simlat M, Błażejczak A & Warchoń M. 2023, Meta-Topolin-induced mass shoot multiplication and biosynthesis of valuable secondary metabolites in *Stevia rebaudiana* Bertoni bioreactor culture. *Sci Rep* 13, 15520
5. Coman V, Scurtu V, Coman C, Clapa D, Iancu S, Leopold N, Leopold L, 2023, Effects of polystyrene nanoplastics exposure on *in vitro*-grown *Stevia rebaudiana* plants, 197, 107634, *Plant Physiology and Biochemistry*, 197, 107634
6. Subrahmanyeswari T, Gantait S, Sarkar R, Kamble SN, Singh S, Bhattacharyya S, 2024, Polyamines and growth inducers-mediated enhanced mono-phasic *in vitro* regeneration of sugar leaf plant (*Stevia rebaudiana* Bert.) in liquid medium, *South Afr J Bot*, 173, 34-45
7. Mercado-Díaz de León L, Garcidueñas-Piña C, Pérez-Molphe-Balch E, Loera-Muro A, Morales-Domínguez JF, 2024, Effect of Bv AgNP on growth, development, and glyoxalase gene expression analysis in *Mammillaria bombycina* and *Selenicereus undatus*. *Mol Biol Rep*, 51(1), 681
8. Jadid N, Anggraeni S, Ramadani MRN, Arieny M, Mas'ud F, 2024, *In vitro* propagation of Indonesian stevia (*Stevia rebaudiana*) genotype using axenic nodal segments. *BMC Res Notes* 17, 45

9. Heliyanto B, Murianingrum M, Hartati RS, Hapsari BW, Purwati RD, Suhara C, Parnidi, Amien S, 2024, Observation on local high-yielding stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni L.) clone specific to Bandung District, West Java. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1302, No. 1, p. 012005). IOP Publishing
10. Bouaaza, G Chetto, O Beniken, L Dziri, L M M'hamed, M Benkirane, R Benyahia, H, 2024, Effect of gelling agent and plant growth regulators on *in vitro* shooting and rooting of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Advances in Agriculture. Article ID 5131187
11. Sota V, Jevremovic S, Abraham E, Danicic V, Bosnjak D, Nacheva L Cvjetkovic B, Andonovski V, Bogunovic S, Kongjika E, Zeljkovic S, Jevremovic D, Markovic Z, Galovic V, Vujovic T, 2025, The Balkan region and the "nano gap": an underexplored dimension of *in vitro* biotechnology for woody plants, Plants, 14(22), 3499
12. Pal D, Kumar M, Yadav MK, Chauhan C, Kumar A, Sirohi U, Sharma V, Chaudhary V, 2025, Effect of various chemical solutions on micropropagation efficiency, antioxidant activities and clonal fidelity analysis of *in vitro* developed plantlets in pomegranate (*Punica granatum* L.) using SSR markers. Vegetos, 38, 796–805
13. Muhammad S, Khan AA, Khan MR, Mukhtar S, Kazmi A, Ali A, Siddiq A, Aileen HRK, Luna-Arias JP, Medina-Pérez G, Pelaez-Acero A, Armenta S, Ahmad A, 2025, Effective substitution of ferrous sulfate with iron oxide nanoparticles enhances growth, antioxidant activity, and stevioside accumulation in micro-propagated *Stevia rebaudiana*, Front Plant Sci, 16, 1569613
14. Manohar KA, Sivasankarreddy K, Shukla G, Chakravarty S, Roy B, Chakravarty S, 2025, Optimization of an Enhanced Micropropagation Protocol of *Stevia rebaudiana* for Mass Production in an Indian Sub-humid Region. Sugar Tech, 27, 844–859
15. Karki R, Ojha P, Maharjan S, Manandhar U, Maharjan S, 2025, Optimization of the germination time of proso and foxtail millets to enhance the bioactive properties, antioxidant activity, and enzymatic power and reduce antinutritional factor, Curr Res in Food Sci, 10, 100987
16. Erkoyuncu MT, 2025, Impact of cellulose and nanocrystalline cellulose on *in vitro* shoot regeneration and biochemical composition of *Echinacea purpurea*". Black Sea Journal of Agriculture 8(5):31-32
17. Dogan M, 2025, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni doku kültürü teknikleri ile üretimi: Güncel yöntemler ve uygulamalar". 4th International Conference on Recent Academic Studies March 04-05, 2025: Konya, Turkey, March 2025

18. Delfi S, Putri S, Santoso P, Idris M, 2025, Twenty-five years research on micropropagation of stevia and curcuma sp. and improving secondary metabolites using precursor-elicitor *in vitro*: A review. Jurnal Biologi Tropis, 25(2), 1921–1940

19. Rodríguez-Páez LA, Jarma-Orozco A, Oloriz-Ortega MI, Rodríguez NV, 2026, Revisiting the ‘Morita II’ Paradigm in *Stevia rebaudiana*: Genetic Bottlenecks, Steviol Glycoside Biology and Precision Breeding Pathways. Sci, 8, 82

20. Nishant & Chandra S, 2026, Green synthesized silver nanoparticles and elicitors enhance stevioside glycoside production in the endophyte *Acremonium sclerotigenum* from *Stevia rebaudiana*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, April 2026

21. Ali A, Zia Z, Kazmi WM, Mateen A, Shah SM, Shah MM, 2026, Mitigating stress and boosting metabolites through the impact of ZnO nanoparticles on *Stevia rebaudiana* and *Ocimum basilicum*. Int J Phytoremediation. 17:1-11, Feb 2026

Статия: 2. Sichanova M, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova E, Nedev T, Tsekova D, Ivanova V, Trendafilova A. Influence of the abiotic elicitors Ag salts of aspartic acid derivatives, self-organized in nanofibers with monomeric and dimeric molecular structures, on the antioxidant activity and stevioside content in micropropagated *Stevia rebaudiana* Bert. Plants. 2023; 12:3574. - Q1 <https://doi.org/10.3390/plants12203574>

Цитирана от:

1. Vu DT, Kletthagen MC, Elvevoll EO, Falch E, Jensen IJ, 2024, Simulated Digestion of Red Sea Cucumber (*Parastichopus tremulus*): A Study of Protein Quality and Antioxidant Activity. Appl Sci. 14(8), 326

2. Sota V, Jevremovic S, Abraham E, Danicic V, Bosnjak D, Nacheva L, Cvjetkovic B, Andonovski V, Bogunovic S, Kongjika E, Zeljkovic S, Jevremovic D, Markovic Z, Galovic V, Vujovic T, 2025, The Balkan Region and the “Nano Gap”: An Underexplored Dimension of *In Vitro* Biotechnology for Woody Plants. Plants. 14(22), 3499

3. Guru GR, Ramteke PW, Veres C and Vagvölgyi C, 2025, Potential impacts of nanoparticles integration on micropropagation efficiency: current achievements and prospects. Front. Plant Sci. 16:1629548