

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Росен Николаев Горгоров

**НАУЧНА ОСНОВА ЗА *EX SITU* ОПАЗВАНЕ НА КОНСЕРВАЦИОННО ЗНАЧИМИ
ВИДОВЕ ОТ РОД *CENTAUREA* S. L. В БЪЛГАРИЯ**

Автореферат

на дисертация
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: 01. 06. 03 Ботаника
Научен ръководител: доц. д-р Светлана Банчева
Научен консултант: доц. д-р Марина Станилова

София, април 2014

Дисертацията се състои от 129 страници, в т. ч. 61 фигури и 18 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 204 заглавия, от които 11 на кирилица и 193 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 14.07.2014 г. от 14:00 часа в заседателната зала на Отдел "Растително и гъбно разнообразие и ресурси" на ИБЕИ, ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 23, на открито заседание на петчленно жури в състав:

1. доц. д-р Анна Ганева (председател)
2. проф. д-р Венета Капчина-Тотева (рецензент)
3. проф. д-р Георгина Костуркова (рецензент)
4. доц. д-р Светлана Банчева (научен ръководител)
5. доц. д-р Ели Зайова

Материалите по защитата на дисертацията са на разположение в библиотеката на Отдел РГРР на ИБЕИ.

1. Увод

Род *Centaurea* s.l. е представен в българската флора със 104 вида (Greuter 2008) и е най-богатият на ендемити род в българската флора (Асьов и др., 2006), както и сред най-богатите на таксони с консервационно значение у нас.

Обекти на настоящата дисертация са девет редки и ендемични вида от род *Centaurea* s.l.: *C. caliacrae* Prodan, *C. davidovii* Urum., *C. diospolitana* (Bancheva & Stoyanov) Bancheva, *C. finazzeri* Adamović, *C. immanuelis-loewii* Degen, *C. mannagettae* Podp., *C. pseudaxillaris* Stef. & T. Georgiev, *C. trinervia* Willd. и *C. wagenitziana* Bancheva & Kit Tan. Тези видове са с единични находища на територията на България и са представени в целия си ареал с няколко на брой и малочислени популации. Опазването на такива видове може да се осъществи чрез *in situ* или *ex situ* методи. То се съчетава с изследване на генетичното разнообразие, както с цел да се следи потенциалът на естествените популации, така и да се подбере подходящ материал за създаване и поддържане на *ex situ* колекции от видовете. За това изследване утвърден подход е използването на молекулярни маркери, в частност изоензимният анализ.

Един от начините за *ex situ* размножаване на растенията е чрез тяхното култивиране *in vitro*. Този метод позволява да бъдат преодолени проблеми при естественото семенно или вегетативно размножаване, като същевременно ускорява процеса и го прави независим от сезона и други фактори на околната среда. В рамките на настоящата работа са представени данни за характеристиката и разпространението на целевите видове, за особеностите на размножаването им, техниките за *ex situ* опазване, наличната информация за *in vitro* култури при *Centaurea*, генетичната стабилност и молекулярните методи за изследване на генетичното разнообразие. Разгледани са наличните хербарни материали в три хербариума (SOM, SO, B). Посетени са по-голямата част от българските популации на целевите видове и е актуализирана информацията за тяхното местоположение и състояние. С материал от тези популации е проведен изоензимен анализ за установяване на генетичното разнообразие. За първи път са въведени в *in vitro* култура представители на род *Centaurea* от българската флора, като се достига до успешна адаптация *ex vitro*. Направен е фитохимичен анализ при някои от видовете.

2. Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се изследват възможностите за *ex situ* опазване на някои критично застрашени видове от род *Centaurea* s.l., като се приложат *in vitro* техники за ускорено размножаване и се вземат под внимание факторите, ограничаващи разпространението им в природни условия.

За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Проучване на наличната информация - литературна справка, справка в хербариумите и др.;
2. Локализиране и картиране на българските популации на изследваните видове;
3. Популационни наблюдения за установяване на състоянието и екологичните особености на популациите;
4. Събиране на растителен материал за проучване на семенното размножаване, за въвеждане в *in vitro* култура и за изследване на генетичното разнообразие при изследваните видове.
5. Изследване на семенното размножаване и генетичното разнообразие на популациите моделни видове; избор на подходящ растителен материал за *ex situ* опазване чрез биотехнологични методи;
6. Разработване на биотехнологични техники за *ex situ* опазване на целевите видове: въвеждане в *in vitro* култура, изследване особеностите на ускореното микроразмножаване, получаване на *in vitro* растения, *ex vitro* адаптация и аклиматизация на растенията;
7. Определяне на съдържанието на общи феноли и флавоноиди от неизследвани видове в проби от *in vitro* култивирани растения и от естествени популации

3. Материали и методи

3.1. Материали

За иницирането на *in vitro* култури, беше събран материал – семена, листа, цветоносни стъбла и кошнички – от естествените находища на целевите видове. При *C. davidovii* бяха използвани и семена, събрани от *ex vitro* адаптирани растения, след техния цъфтеж на открито в експерименталната площ на ИБЕИ през 2013 г.

След въвеждане в култура беше използван материал от *in vitro* получените растения за изпробване влиянието на състава на хранителната среда, за получаване на калус, за директна и индиректна органогенеза, в агарови и течни хранителни среди.

За фитохимичните проучвания бяха използвани изсушени листа и корени от *in vitro* култивирани растения *C. davidovii* и *C. pseudaxillaris*, изсушени листа от естественото находище на *C. davidovii* и от *ex vitro* адаптирани растения от този вид, както и изсушени листа от естествените находища на *C. finazzeri* и *C. trinervia*.

От естествените находища на видовете са събрани хербарни материали за колекцията на SOM.

За изоензимен анализ беше използван материал от свежи листа, събрани от естествените находища на видовете.

За хистологично наблюдение беше използван *in vitro* получен калус от листа, както и части от листа.

3.2. Методи

3.2.1. Морфологични и хорологични описания

Морфологичните описания и хорологичните данни за видовете са съставени по собствени наблюдения и литературни данни (Пеев и др., 2011; Apostolova & Denchev, 1997; Bancheva & Gorgorov, 2010; Bancheva & Raimondo, 2003; Bancheva & Stoyanov, 2009; Gussev & al., 2002; Petrova & Vladimirov, 2009, 2010).

3.2.2. Популационни наблюдения

При популационните наблюдения е използвана Методиката за мониторинг на висши растения от Националната система за мониторинг на биологичното разнообразие на Изпълнителната агенция по околната среда (<http://eea.government.bg/bg/bio/nsnbr>).

3.2.3. *In vitro* размножаване

3.2.3.1. Въвеждане в *in vitro* култура

Семената бяха стерилизирани чрез последователно третиране със 70% етанол за 1 или 2 минути и разтвор на натриев хипохлорит (домакински препарати със съдържание на NaClO <5%: белина и Domestos) за 10 или 20 минути. След стерилизацията семената бяха промивани със стерилна дестилирана вода трикратно за 5 мин.

Стерилизираните семена бяха поставяни в агарова хранителна среда MS (Murashige & Skoog 1962) в пластмасови култивационни съдове (с пасивна вентилация (Duchefa, The Netherlands) и Magenta GA7 (PhytoTechnology Laboratories, USA). В тези съдове бяха култивирани и растенията.

Поникналите растения бяха култивирани във фитостатно помещение при температура 24±2°C , осветление 3000 lux и фотопериод 16/8 ч светлина/тъмнина.

3.2.3.2. Хранителни среди

Всички използвани хранителни среди са на основата на среда MS, с добавяне на 30 g/l захароза. Използвани бяха 25 варианта на твърди (със 6.5 g/l агар – Duchefa Plant agar) или течни хранителни среди, с или без добавени растежни регулатори (Табл. 1).

Табл. 1. Хранителни среди и добавени растежни регулатори. Средата 1/2MS има намалена наполовина концентрация на солите на макроелементи спрямо състава на MS.

Вариант	Растежни регулатори					
	BAР	IBA	NAA	2,4-D	TDZ	2iP
MS						
1/2MS						
C2	0.5					
B1	1.0					
I1		0.5				
I2		1.0				
N1			0.5			
N2			1.0			
C3			2.0			
CG				10.0		
CA2				0.1		
IP1						1.0
IP2						2.0
C1	0.5		2.0			
C4	1.0		0.1			
C5	1.0		0.3			
C6	4.0		0.1			
CC1	0.5		0.5			
CC2	0.5		0.1			
CA3	0.5			0.2		
C9	1.5			1.5	3.5	
CE	2.2			1.5		
C7	1.4				3.5	
C7i					3.5	1.4
C8	1.5		2.5		6.0	

Хранителните среди и култивационните съдове бяха стерилизирани чрез автоклавиране при 121° С и налягане 1 atm за 20 мин. Всички съставки на средите са добавяни в тях преди стерилизацията.

3.2.3.3. Условия на култивиране

Част от калусните култури бяха култивирани на една и съща хранителна среда, при температура $24 \pm 2^\circ \text{C}$, на тъмно и на светло - при осветеност 3000 lx и фотопериод 16/8 ч светлина/тъмнина; всички останали култури бяха култивирани при температура $23 \pm 2^\circ \text{C}$, осветеност 3000 lx и фотопериод 16/8 ч светлина/тъмнина.

За култивиране в течна среда бяха използвани култивационни съдове Duchefa и Magenta, както и системата за култивиране с временно потапяне (TIS) RITA® с автоматично включване четири пъти в денонощието за 5 мин,

Калусни тъкани бяха култивирани в течна среда в колби от 300 ml със 150 ml хранителна среда на клатачен апарат при 100 об./мин без осветление, в продължение на един месец.

При прехвърлянето на свежа хранителна среда бяха изрязвани листата и корените на растенията, като бяха запазвани един или два от най-младите листа и по около 1 см. от корените.

Ефективността на *in vitro* размножаването беше отчитана чрез размножителен коефициент (PC, propagation coefficient), който представлява средния брой на новополучените растения от един експлант за определено време.

3.2.4. Ex vitro адаптация и аклиматизация

Растенията бяха поставяни в автоклавиран (при същите параметри, както хранителните среди) почвен субстрат, съдържащ торф, пясък, кокосови стърготини и тор от калифорнийски червей, в саксии с диаметър 9 см, по едно в саксия. Те бяха адаптирани в продължение на 3-4 седмици в климатичен шкаф с контролирана температура, осветление, вентилация и влажност на въздуха, като влажността на въздуха беше намалявана постепенно от 90% на 60%.

След периода в климатичния шкаф, растенията бяха отглеждани във фитотрон при температура 16 - 28°C, влажност 25 – 60% и комбинирано осветление от слънчева и изкуствена светлина. След адаптация част от растенията бяха пренесени в оранжерията на ИБЕИ в София, а друга част бяха засадени в почва на откритата площ до оранжерията.

3.2.5. Изoenзимен анализ

Изследвани бяха следните ензимни системи: ААТ – аспартатаминотрансфераза (Е.С. 2.6.1.1), АДН – алкохолдеhidрогеназа (Е.С. 1.1.1.1), ЕСТ – естераза (Е.С. 3.1.1.-), G-6-PGD – глюкозо-6-фосфатдеhidрогеназа, IDH – изоцитратдеhidрогеназа (Е.С.1.1.1.42), LAP – левцинаминопептидаза (Е.С. 3.4.11.1), MDH – малатдеhidрогеназа (Е.С. 1.1.1.37), ME – малик ензим (Е.С. 1.1.1.40), PGD – фосфоглюконатдеhidрогеназа (Е.С. 1.1.1.14), PGI – фосфоглюкоизомераза (Е.С.5.3.1.9), PGM – фосфоглюкомутаза (Е.С. 5.4.2.2), SKD – шикиматдеhidрогеназа (Е.С. 1.1.1.25).

Беше използвана методиката на Wendel & Weeden (1989) за визуализиране ензимите.

От наблюдавания брой електрофоретични ивици, съответстващ на изоформите на съответния ензим, беше направен извод за наличието на изменчивост в изследваните популации.

3.2.6. Микроскопски наблюдения

Калус, части от растения и тъкани бяха наблюдавани под бинокулярна лупа и микроскоп (трайни и нетрайни препарати). За хистологични наблюдения бяха приготвяни трайни микроскопски препарати.

3.2.7. Фитохимичен анализ

3.2.7.1. Получаване на растителните екстракти

Изсушените и смлени листа бяха екстрахирани с 80% воден метанол. Получените растителни екстракти бяха използвани за определяне на общото съдържание на фенолни съединения и флавоноиди.

3.2.7.2. Определяне на общото съдържание на фенолни съединения (ОСФС)

Общото количество на фенолните съединения беше определено по модифицирания метод на Singleton (Ghotbabadi & al. 2012).

3.2.7.3. Определяне на общото съдържание на флавоноиди

Общото количество на флавоноиди беше определено по метода на Zhishen & al (1999).

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Състояние на популациите.

***Centaurea caliacrae* Prodán**

Природозащитен статут. Въпреки силно ограниченото си разпространение, към настоящия момент видът няма природозащитен статут в България, но е балкански ендемит.

Местообитания и популации. Сухи тревисти и каменисти места, в състава на отворени ксеротермни съобщества. Популациите са жизнени и са изградени най-често от 30–100 индивиди, локализиращи върху силно ограничена площ (по около 300 до 900 m²). Намират се в Североизточна България (Побитите камъни, местн. Сиври тепе, южно от с. Чернево, Варненска обл. и резерват “Калиакра”), на 100–140 м н. в.

Наблюдения и събиране на материал за нуждите на настоящото изследване са извършени в популацията от местн. Сиври тепе, южно от с. Чернево, Варненска обл. (N 43,249718°; E 27,600962°).

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; силната ерозия, залесяването, унищожаването на местообитанието, заради добиване на инертни материали е потенциална заплаха.

***Centaurea davidovii* Urum. (Давидова метличина)**

Природозащитен статут. Въпреки изключително ограничения си ареал, към настоящия момент видът няма природозащитен статут. Съгласно критериите на IUCN (2001) видът е класифициран като „Критично застрашен” (Bancheva & Gorgorov, 2010). Български ендемит.

Местообитания и популации. Расте из ливади и пасища с проветрива и суха почва в Западна и Средна Стара планина, над горната граница на гората, на 1600 – 1800 м н. в. Изложението най-често е южно, с южна компонента или източно. Скалната основа е силикатна. Почвите са плитки или със средна мощност, по-рядко дълбоки, винаги каменисти и пясъчливи, но и с много хумус.

За нуждите на настоящото изследване са проучени 3 популации на вида – край хижа Козята стена, край хижа Рай и край хижа Мазалат. В първата популация числеността е много ниска – установени са едва десетина туфи от целевия вид, край хижа Рай са установени 60 туфи, а край хижа Мазалат – 40. Доминиращите видове в тези ливади са житни растения, някои от които развиват големи туфи. Тревостоят е висок, често до 60–80 см.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида и промяната в състава на растителните съобщества – на места туфите на житните са толкова плътно една до друга, покриват цялата повърхност на участъка и други видове не успяват да се развиват; охрастяването с обикновена хвойна (*Juniperus communis*), главно заради преустановяването на пашата.

***Centaurea diospolitana* (Bancheva & Stoyanov)**

Природозащитен статут. Въпреки изключително ограничения си ареал, към настоящия момент видът няма природозащитен статут. Съгласно критериите на IUCN (2001) видът е класифициран като „Критично застрашен” (Bancheva & Stoyanov, 2009). Български ендемит.

Местообитания и популации. Расте по периферията на сухи, каменисти поляни в термофилни дъбови гори. Понастоящем е известен от 4 популации в Тунджанска хълмиста равнина (в близост до селата Чернозем, Вълча поляна, Лесово, Малко Кирилово, Елховско) и 1 в Сакар (край с. Устрем, Тополовградско), до 500 м надм.в. Наблюдения са извършени във всичките известни към днешна дата популации. Най-многочислена е тази от с. Устрем, установена през 2012 г (Bancheva & al. 2012), наброяваща близо 1000 индивида. В останалите популации са установени общо около 800 индивида. Всичките популации влизат в обхвата на екологичната мрежа НАТУРА 2000 в защитени зони BG0000212 - Сакар (с. Устрем) и BG0000218 - Дервентски възвишения (всички останали), в състава на прородно местообитание 91M0 Балкано-панонски церово-горунови гори от Директива 92/43/ЕЕ за запазване на природните местообитания на дивата флора и фауна.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; унищожаването на местообитанието, към което видът е привързан; пожари в находището в Дервентски възвишения; добиване на инертни и други строителни материали в находището в Сакар.

Centaurea finazzeri Adamovic (Скална метличина)

Природозащитен статут. Включен е в ЗБР, в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Критично застрашен”. Балкански ендемит (Petrova & Vladimirov 2010).

Местообитания и популации. Видът има една популация в България, намираща се в долината на р. Струма, Земенски пролом, от западната страна на железопътната линия. Площта ѝ е 44 ха. Находището се намира в скално местообитание на 550 - 800 м н. в. и има наклон 26 - 35°. Почвите са варовикови, сухи, плитки, слабо ерозирани. Липсват дървесни видове; проективното покритие на храстите е до 10%; те са *Fraxinus ornus* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Ostrya carpinifolia* Scop., *Colutea arborescens* L., *Quercus pubescens* Willd., *Chamaecytisus supinus* (L.) Link. Проективното покритие на тревистите видове е 30-50%, а на *C. finazzeri* – 0.25%. Плътноста на популацията е по-малка от един индивид/м²; индивидите са разпределени равномерно.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; унищожаването на местообитанието, заради инфраструктурни проекти или добиване на инертни материали.

Centaurea immanuelis-loewii Degen (Имануелова метличина)

Природозащитен статут. Включен е в ЗБР, в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Застрашен”, както и в Приложение 4 на Директива 92/43/ЕЕ за запазване на природните местообитания на дивата флора и фауна и в IUCN (2011). Видът е балкански ендемит (Petrova & Vladimirov 2010).

Местообитания и популации. Расте по сухи каменисти места и сипеи, предимно с южно или югозападно изложение, върху кисела основна скала. Участва в състава на отворени ксеротермни съобщества, които често попадат в обхвата на 2 природни местообитания от Директива 92/43/ЕЕ за запазване на природните местообитания на дивата флора и фауна 62А0 Източно субсредиземноморски сухи тревни съобщества и 8210 Хазмофитна растителност по варовикови скални склонове, както и в техните комплекси. Популациите са жизнени и са изградени най-често от 100–400 индивиди, локализиращи върху ограничена площ (по около 300 до 1000 м²). Изключение прави популацията от Голо Бърдо, защитена зона „Острица”, където са установени хиляди индивиди на площ от около 34 ха (Стоянов, 2013). Видът е установен в Знеполски район (Конявска планина, Голо бърдо), Струмска долина (Бобошевски Руен, Сандански, Кресна, с. Ощава) и Пирин (Ю), с. Влахи, на 100–900 м н. в. (Нинова, 1984; Apostolova & Denchev, 1997; Gussev & al., 2002).

Видът има малки, изолирани популации във всичките си находища, с изключение на това от защитена зона „Острица”, за която чрез екстраполация е посочена референтна стойност от над 24 000 индивиди (Стоянов, 2013). За нуждите на настоящото изследване са проучени находищата в Конявска планина (с. Цървеняно), Бобошево, до с. Влахи, до Сандански (с. Лиляново). Надморската височина на находищата е от 243 до 1012 м. Числеността на вида в площадките е от 3 до 11 индивиди, като най-голям е броят им в площадките до Бобошево.

Съотношението между вегетативни и генеративни индивиди варира. При всички площадки почвите са сухи и плитки; при Бобошево наклонът на терена е най-малък – до 10° - и там се намират относително най-многочислените популации. В това находище ерозията е слаба, докато при всички останали, с изключение на една от площадките - при с. Влахи - тя е силна. Наклонът на терена най-често надвишава 30-40°, а при три площадки достига 75-85°. Проективното покритие на вида е пропорционално на общото покритие на растителността – в площадките, където на *C. immanuelis-loewii* се падат до 2%, вторият показател не надвишава 30%. Само в четири от площадките има дървесни видове, като в три от тях тези видове са конкурентни спрямо метличината – *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle и *Pinus nigra* Aiton.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; унищожаването на специфичното местообитание, заради добиване на строителни и инертни материали в находището в Конявска планина, строеж на пътища и магистрали в находищата в Голо Бърдо (край с. Старо село) и в Струмска долина (с. Цървеняно).

***Centaurea mannagettae* Podp. (Манагетова метличина)**

Природозащитен статут. Включен е в ЗБР, в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Застрашен”. Видът е балкански ендемит (Petrova & Vladimirov, 2010).

Местообитания и популации. По сухи каменисти места с варовикова скална основа и хумусно-карбонатни почви. Популациите са жизнени, но са силно фрагментирани, с ограничена площ (по около 500 до 1000 m²) и са изградени най-често от няколко десетки индивида. Българските популации се намират в Славянка, Пирин (х. Яворов, Пеещите скали, Бялата вода, склоновете над Банско), Рила, Тракийска низина (Бесапарските ридове) и Тунджанска хълмиста равнина (с. Устрем, Тополовградско), на 300–1400 m н. в. В рамките на настоящата разработка са изследвани и е събран материал от две популации: в Бесапарските ридове (над с. Огняново) и Пирин, над Банско.

Находището край с. Устрем (N 42°22'.01"; E 26 ° 25'30.76") е разположено върху варовиков хълм на 2.5 км СЗ от селото по права линия, в посока с. Мрамор. Изложението е ЮЗ, а наклонът е 35-40°, като почви почти липсват. Покритието на растителността е под 20%, като участието на храсти е около 2% (*Juniperus oxycedrus* L., *Jasminum fruticans* L.). Числеността на локалната популацията е около 50 индивида, разположени поединично или на малки групи.

Находището в Бесапарските ридове се намира в района на гара Огняново, в билната част на хълм с югоизточно изложение и наклон 21-25°. Хълмът е варовиков, с плитки почви. Липсва храстова и дървесна растителност; проективното покритие на тревистите видове площта, заета от популацията на вида е 50%, а на *C. mannagettae* – 10%. Установени са около 200 индивида с групово разположение.

От флористичен район Пирин е изследваното находището край Банско, на 1176 m н. в. За разлика от другите 2 популации тази е разположена в гора от *Pinus sylvestris* L.. Числеността възлиза на около 60 индивида с групово разположение.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; унищожаването на спицифичното местообитание, заради добиване на строителни и инертни материали в находището край с. Устрем и заради построяването на ски писти в това край Банско; находището край Огняново е заплашено от разораване.

***Centaurea pseudaxillaris* Stef. & T. Georgiev (Тракийска метличина)**

Природозащитен статут. Включен е в ЗБР, в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Критично застрашен”. Видът е български ендемит.

Местообитания и популации. Расте из тревисти места и по периферията на каменисти поляни в разредени дъбови и смесени гори в Тракийската низина и Тунджанската хълмиста равнина, от 100 до 450 m н. в. Среща се със сигурност в две находища: Бесепарските ридове между с. Огняново и с. Синитево и между селата Крепост и Добрич (община Димитровград), като втората популация е открита наскоро, през 2011 г. (Bancheva & al. 2013). В литературата се посочват и следните находища: с. Нова махала, с. Любен, с. Поповица, Хасково, Димитровград, Стара Загора, Тополовград, с. Голям Манастир, с. Омарчево, с. Ботево, с. Бояджик. За съжаление в повечето от тях популациите на вида са унищожени, поради унищожаване на местообитанията, към които *C. pseudaxillaris* е привързана. Популациите са малочислени, като в находището на Бесепарските ридове са установени между 137 индивида (през 2011 г.) и 250 индивида през 2012 г. Новоустановената популация е с двойно по-голяма численост – около 400 – 500 индивида, като попада в обхвата на местообитание от Директива 92/43/ЕЕ за запазване на природните местообитания на дивата флора и фауна 91M0 Балкано-панонски церово-горунови гори с доминиращо участие на благун (*Quercus frainetto* Ten.) и цер (*Quercus cerris* L.). Популацията от Бесепарските ридове попада в обхвата на защитена зона от екологичната мрежа НАТУРА 2000 BG0000254 „Бесепарски възвишения”.

Заплахи. Сред основните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; унищожаването на спицифичното местообитание, към което е привързан; пожари в находището от Бесепарските ридове.

***Centaurea trinervia* Willd. (Трижилкова метличина)**

Природозащитен статут. Включен е в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Критично застрашен”. Терциерен реликт.

Местообитания и популации. Трижилковата метличина е един от най-редките видове растения в България. Съобщен е за флората на страната наскоро от българския ботаник Антоанета Петрова (Petrova 2007). Единственото ѝ находище в страната се намира във флористичен район Североизточна България, в местностите Таушан тепе и Тепичките тепета, в землището на с. Невша, област Варна. Състои се от 2 фрагмента – един основен, разположен по ЮИ склон на Таушан тепе и наброяващ 26 туфи и втори фрагмент от 4 туфи, разположени върху третото от Тепичките тепета. Двата фрагмента отстоят на около 0,750 км разстояние един от друг. Цялата площ на двата фрагмента е около 1 дка. Обитава сухи, слънчеви места, по излази на мергелни глини с рядка растителност.

Заплахи. Сред основните заплахи са изключително ниската численост популацията; ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; паразитите по растенията; промените в състава на растителното съобщество (предимно обрастване с храсти).

***Centaurea wagenitziana* Bancheva & Kit Tan (Вагеницова метличина)**

Природозащитен статус. Включен е в ЗБР, в Червена книга на България (Банчева 2012) и в Червен списък на висшите растения в България (Bancheva 2009) с категория „Критично застрашен”.

Местообитания и популации. По периферията на поляни в гори от цер и благуи, върху канелени горски почви. Вагеницовата метличина е един от най-редките видове растения не само в България, но и в света, с две малочислени находища у нас, отстоящи на около 4 км едно от друго, във флористичен район Тунджанска хълмиста равнина. Първото е в гората между селата Голям Дервент, Лесово и Вълча поляна, Елховско и в няколко изоставени ниви, до 350-400 м н.в., а второто (установено през 2013 г.) е в гората между селата Малко Кирилово и Вълча поляна, Елховско, на 290-300 м н.в. В миналото видът (определян погрешно като *Centaurea amplifolia*) е бил известен от 3 локалитета: Сакар – между Тополовград и с. Планинец (където не е намиран повече от 30 години) и Южно Черноморско крайбрежие – Бакърлъка, Созопол и с. Мандра, Бургаско (където не е намиран повече от 70 години).

Находището край с. Голям Дервент включва около 500 индивида, а това край с. Вълча поляна около 30 индивида. Площта на двете находища е около 45 ha. Индивидите са с групово разположение. Интересен е фактът, че след като образуват семена се оказва, че повече от половината от кошничките са заразени с ларви на насекоми. Данните, с които разполагаме от описването на вида до днес показват стабилност в числеността на популацията.

Заплахи. Сред най-важните заплахи са ниският възобновителен потенциал и слабата конкурентна способност на вида; паразитите по растенията; промените в състава на растителното съобщество (предимно обрастване с храсти); пожари; унищожаване на местообитанието, към което видът е привързан; залесяване или сеч.

4.2. Изоензимен анализ

Изследването на генетичната изменчивост чрез изоензимния подход засяга избрани популации и видове, като целта беше на този етап да се разработи протокол за извършване на такова изследване в род *Centaurea* и да се направи бърз скрининг в кои популации и видове има по-висока вътрешнопопулационна изменчивост. Именно индивиди от такива популации се предпочитат за съхранение *ex situ*.

Изследвани бяха 11 популации от следните 7 вида: *C. davidovii*, *C. finazzi*, *C. immanuelis-loewii*, *C. mannagettae*, *C. pseudaxillaris*, *C. trinervia* и *C. wagenitziana*. За нито един от тези таксони не са провеждани изоензимни изследвания до настоящия момент. Това наложи да се тестват 12 различни ензимни и 5 буферни системи. От всички тествани комбинации на буфер и ензимна система, резултати се получиха при следните: PGI, ААТ и МЕ с буфер

WW6, PGI и AAT с буфер WW5, IDH и PGI с буфер WW3 (При PGI/ WW3 визуализацията е слаба).

Най-голяма изменчивост беше установена при *C. mannagettae* в двете ѝ популации – при гр. Банско и с. Огняново, с ензимната система PGI - проявиха се 2 локуса, които показват много висока изменчивост и при двете популации по 3 алела (Фиг. 1).



Фиг. 1. Изоензимен профил на PGI при *C. mannagettae* от находища Огняново и Банско.

Резултатите от изоензимното изследване показват, че при повечето изследвани популации има силно изразена вътрешнопопулационна изменчивост. Независимо, че при проучване на ендемични и други консервационно значими видове с ограничено разпространение очакването е генетичната изменчивост на популациите да е сравнително ниска, подобни на нашите резултати са установени и за други растения (Bancheva & al. 2006, 2012). Тези факти свидетелстват за наличие на кръстосано опрашване в популациите на изследваните видове, както и че преобладава семенното размножаване. Високата генетична изменчивост в популациите улеснява значително подбора на материал за микроразмножаване и за *ex situ* опазване. В този смисъл, почти всяка една от популациите на изследваните видове е подходяща за тези цели от гледна точка на съхраняване на колкото е възможно повече разнообразни генотипове (с изключение на тази от *C. immanuelis-loewii* от с. Цървеняно). Популацията на *C. wagenitziana* също не показва изменчивост в единствената ензимна система (ME), по която са получени резултати в рамките на разработването на дисертационния друд, но тя е единствената известна в България и вероятно единствената оцеляла в света (Tan & al. 2009), така че независимо от резултатите е необходимо да бъде опазвана *ex situ*.

4.3. *In vitro* култивиране

4.3.1. Обеззаразяване на изходния материал

Стерилизация на семена

При всички целеви видове бяха успешно стерилизирани семена за въвеждане в *in vitro* култура. Стерилизацията на семената чрез третиране със 70% етанол и 0,5% NaClO (белина) при повечето опити е успешна, като наблюдаваните случаи на зараза при тези опити са случайни и не зависят от продължителността на третирането.

Стерилизация на листни и стъблени експланти и на съцветия

Използването на листни и стъблени експланти от диворастящи растения е затруднено от комбинацията на силна заразеност с микроорганизми и голяма чувствителност на зелените части на растенията към стерилизиращите агенти.

Експериментите по стерилизация на зелени части от растенията при *C. mannagettae*, *C. pseudaxillaris*, *C. wagenitziana* и *C. diospolitana* показват, че въпреки големия брой заразени експланти, е възможно тези части да се използват за въвеждане в култура. Такава беше получена от *C. wagenitziana* и *C. diospolitana*.

Въвеждането в *in vitro* култура от семена е за предпочитане пред използването на вегетативни части на растенията не само поради по-трудната стерилизация в първия случай, но и от гледна точка на генетичното разнообразие на получените растения, което се запазва в по-голяма степен.

4.3.2. Кълняемост на семената

Кълняемостта при повечето от целевите видове беше изключително ниска, като забележително изключение в това отношение беше *C. caliacrae* (87 - 94% кълняемост) и до известна степен *C. finazzeri* (20%). Семената, при които стерилизацията не беше успешна, бяха прехвърлени в почва от естествените находища, за да бъде използван пълноценно събраният от редките видове материал. Това даде възможност да се оцени кълняемостта както в хранителна среда, така и в почва. Цъфтежът на адаптираните *ex vitro* растения *C. davidovii* позволи да се проведе опит за кълняемост и с техните семена. Макар и малък брой, наличието на покълнали семена от адаптираните растения е един от показателите за нормалното им развитие след периода на *in vitro* култивиране.

След цъфтежа *in vitro* на растения *C. davidovii*, въведени в култура от семена от *ex vitro* адаптирани индивиди, беше установено, че в една от кошничките има семена (14 бр.). Тези семена бяха поставени в среда MS, но не покълнаха. Този резултат беше очакван и потвърждава, че *C. davidovii* е кръстосано-опрашващ се вид.

Значителна част от семената на всички видове бяха повредени от насекоми, които нападат кошничките в самото начало на цъфтежа. При видове с ограничено разпространение и малочислени популации, това е допълнителен фактор, който, наред с ниската кълняемост, ограничава способността им за семенно размножаване.

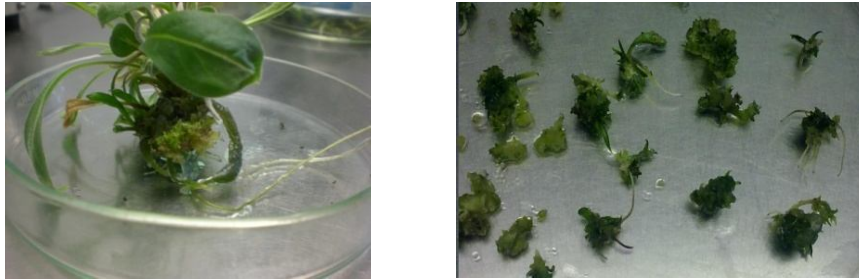
Времето за покълнване варира в широки граници: от три дни при *C. caliacrae* и *C. finazzeri*, 14 дни при *C. trinervia*, 16 дни при *C. wagenitziana*, 50 дни при *C. davidovii* (едно семе), до 70 дни при *C. diospolitana* (едно семе) и *C. pseudaxillaris* (едно семе).

4.3.3. Директна органогенеза

При *C. caliacrae* се образуваха адвентивни стъбла на среди C1, C2 и C3, като най-голям е броят им на C2, съдържаща 0.5 mg/l BAP – до три нови стъбла на растение.

При *C. davidovii*, където покълна само едно семе, полученото растение образува адвентивни стъбла на среда без растежни регулатори. В основата на първото растение се

образува твърда зелена тъкан, по чиято повърхност се намираха многобройни, малки листчета. Някои от тях продължаваха да нарастват и образуваха нови стъбла, които в отделни случаи имаха собствени корени (Фиг. 2).

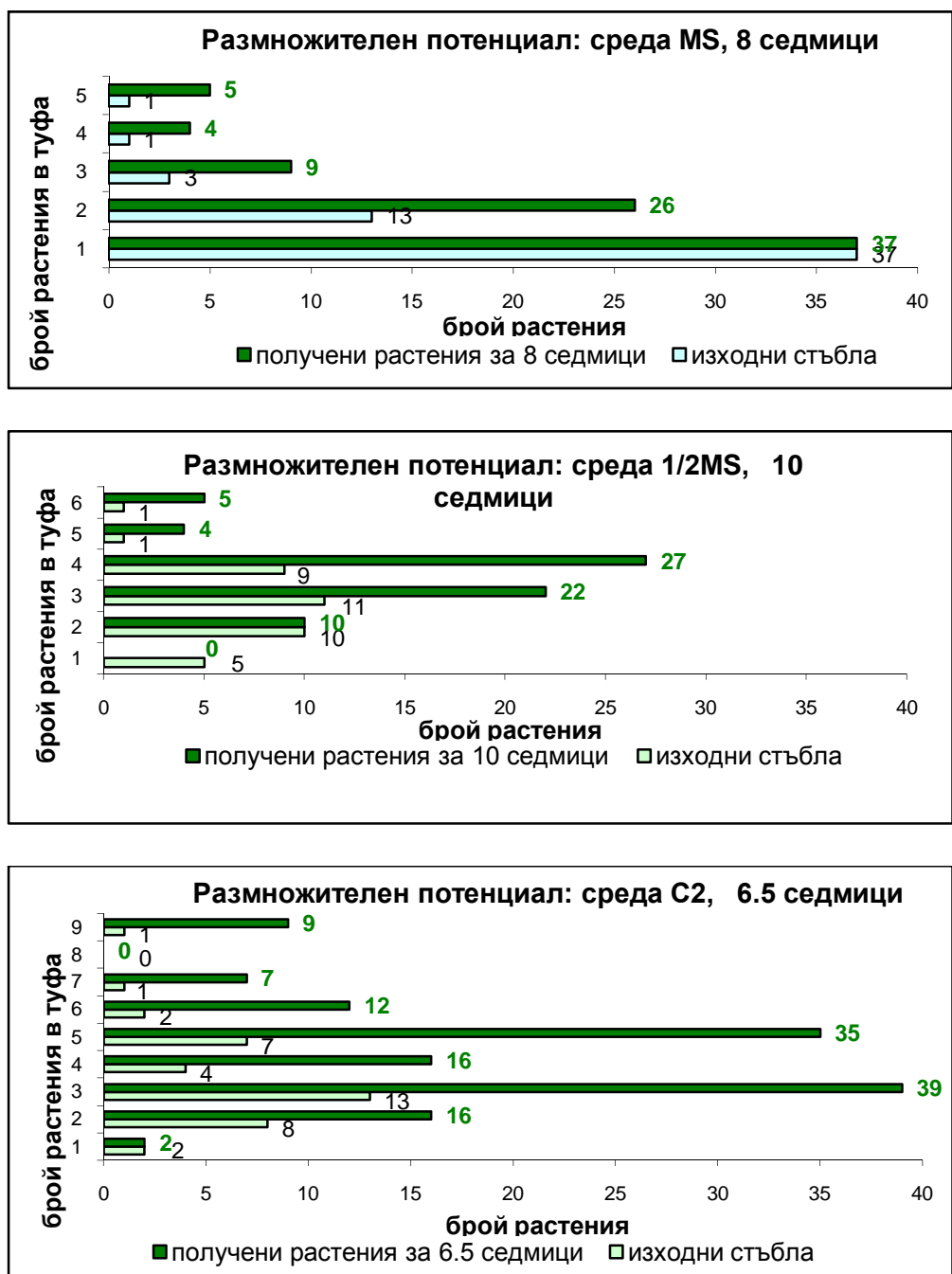


Фиг. 2. Нови растения върху приосновната тъкан при *C. davidovii* на среда MS без растежни регулатори.

При отделяне на тези стъбла и поставянето им на същата среда, нарастването им продължаваше, като растенията образуваха и корени. Когато се отделяха части от приосновната тъкан, която не се беше диференцирала до стъбла, те не се развиваха по-нататък.

На хранителна среда C2, съдържаща 0,5 mg/l BAP, броят на адвентивните стъбла при *C. davidovii* се повишаваше, както при *C. caliacrae* и *C. raii*. Тази среда дава възможност да се постигне по-висок размножителен коефициент (PC) при по-кратко време на култивиране - Фиг. 3. При тази среда процентът на вкореняващите се растения беше по-малък; той е $84\% \pm 0.9$ на среда MS, $96.9\% \pm 4.4$ на среда $\frac{1}{2}$ MS и само от 8.7 до 40% на среда C2. Това показва, че е удачно за етапа на размножаване да се използва среда C2, а за етапа на вкореняване с цел *ex vitro* адаптация – среда без растежни регулатори.

След прехвърляне от среда C2 на $\frac{1}{2}$ MS, *C. davidovii* образува корени както и растенията, които бяха култивирани само на основната среда



Фиг. 3. Сравнение на размножителния потенциал на *C. davidovii* на среди MS, 1/2 MS и C2.

4.3.4. Калусообразуване

Калус се образува при листните и коренови експланти, както и в основата на субкултивираните стъбла (Табл. 4). Образуването му е видимо още в първата седмица от култивирането (Фиг. 4). Независимо от използваната хранителна среда, калусът, получен от листни експланти, е зелен, а този от коренови – сивкав. Това показва, че въпреки

диференциацията на клетките при образуване на калус, хлоропластите на листните клетки се запазват.

4.3.5. Индиректна органогенеза

4.3.5.1. Индиректна органогенеза от листни експланتي

Регенерацията на цели растения от листни експланти беше най-успешна на среда В1 (съдържаща 1mg/l BAP). На тази среда листните експланти от *C. caliacrae*, *C. davidovii* и *C. pseudaxillaris* образуваха калус и малки листни розетки (Фиг. 5), част от които продължаваха да нарастват и след прехвърляне на основната среда (MS или 1/2MS) се развиха до пълноценни растения и се вкорениха.

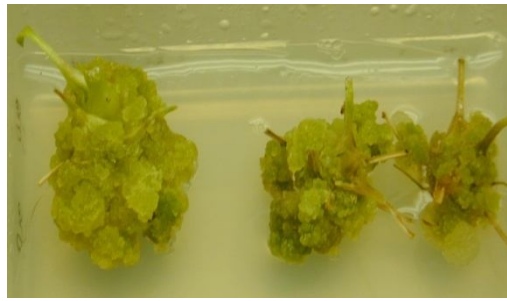
Табл. 4. Калусообразуване при различните видове, експланти и хранителни среди.

Вид	Експлант	Хранителна среда
<i>C. caliacrae</i>	листа	В1, С1, С2, С3, С6, СС1 и СС2
	корени	С1, С2, С3, С6, СС1 и СС2
<i>C. davidovii</i>	листа	В1, С4, С5, С6, С7, С7i, С8, С9, СА2, СА3, СС1
	корени	С7, С8
<i>C. diospolitana</i>	листа	С1, С4, С5, С6, СА3
<i>C. finazzeri</i>	листа	С7
<i>C. pseudaxillaris</i>	листа	В1
	корени	В1, СА3, IP1
<i>C. trinervia</i>	листа	С2, СА3
<i>C. wagenitziana</i>	листа	С1, С4, С5, С6, СС1, СС2

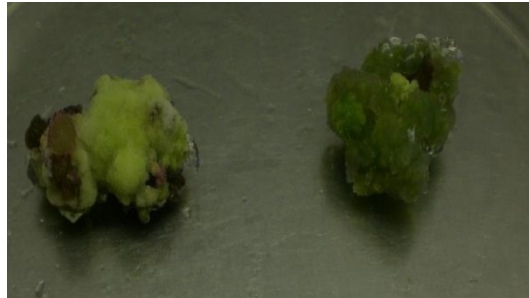
При *C. caliacrae* от 28 листни експланта на среда В1 за 1.5 месеца бяха получени общо 21 нови растения, което съответства на РС = 0.75. Коефициентът при *C. caliacrae* е повече от два пъти по-висок при време на култивиране по-дълго само с две седмици, отколкото при другите два вида. От друга страна, при *C. caliacrae* на среда С2 (с 0.5 mg/l BAP) субкултивираните стъбла образуват калус в основата си, но не образуват повече адвентивни стъбла, отколкото на основната среда MS – за разлика от *C. davidovii*, при която на среда С2 се образуват значително повече адвентивни стъбла. Това показва, че за микроразмножаване на *C. caliacrae* може да се използва индиректната регенерация от листни експланти, докато при *C. davidovii* за предпочитане е директната органогенеза при стъбла.



1



2



3



4



5

Фиг. 4. 1) Калус от листа на *C. finazzeri* на среда C7; 2) Калус в основата на розетки на *C. davidovii* на среда C9; 3) Калус от листа на *C. wagenitziana* (ляво) и *C. davidovii* (дясно) на среда CC1; 4) Калус от листа на *C. davidovii* на среда CC2; 5) Калус по корени на *C. pseudaxillaris* на среда CA3.



1



2



3

Фиг. 5. Образуване на нови растения върху листни експлант на среда B1. 1) *C. caliacrae*, 2) *C. davidovii*, 3) *C. pseudaxillaris*.

На среда С7 листа от *C. davidovii* и *C. finazzeri* образуваха туфи малки листа, от които се развиха растения. При *C. davidovii* бяха получени отделни регенеранти и от листни експлантанти на среди С7i и СА2.

След получаването им от листните експлантанти, новите растения бяха прехвърлени на основните среди MS и 1/2MS, където се развиваха нормално, образуваха нови стъбла и корени. Размножителният коефициент на растения *C. davidovii*, получени чрез директна органогенеза и култивирани само на среда MS, и този на получените от листни експлантанти на среда С7 чрез индиректна органогенеза и прехвърлени след това на MS, не се различава съществено. Коренообразуването при растенията, получени на С7, е по-слабо – 36% от тях имат корени, в сравнение с 84% на MS и 97% на 1/2MS.

През лятото на 2012 г. растения *C. davidovii*, получени на среда В1 чрез индиректна органогенеза, образуваха пъпки и едно от тях цъфна *in vitro* (Фиг. 6). Това е един от двата известни случая на цъфтеж при *Centaurea in vitro*, като в другия видът е *C. cyanus* (Alaiwi & al. 2012). Бутонизация настъпи по същото време и при 18% от растенията, получени на среда С2 и култивирани след това на 1/2MS, но те не цъфнаха.



Фиг. 6. Цъфтеж *in vitro* при растение *C. davidovii*, регенерирано от листен експлант на среда В1.

4.3.5.2. Индиректна органогенеза от коренови експлантанти

Чрез регенерация от коренови експлантанти бяха получени растения от *C. pseudaxillaris*. Първите от тях бяха получени от коренов експлант на среда СА3, съдържаща комбинация от цитокинин и ауксин (0.5 mg/l ВАР и 0.2 mg/l 2,4-D). Той образува калус, който за един месец се разрасна силно и беше субкултивиран на среда С2, от която беше изключен ауксинът (0.5 mg/l ВАР) и на основна среда MS без растежни регулатори, като във всеки от двата варианта бяха поставени по 9 фрагмента калус. На среда С2 два от деветте калусни експлантанти образуваха общо три нови растения след 1,5 месеца; единият две, а другият – едно (Фиг. 7). Върху калуса се образуваха малки листа, подобно на процеса при листните експлантанти на среда В1 при другите видове. При контролния вариант – 9 фрагмента калус, прехвърлени на среда MS – се образуваха корени, но не и листа. Това предполага, че след дедиференциацията на клетките от кореновите тъкани на среда СА3, калусът се диференцира на средата без растежни регулатори в посока на тъканта, от която произхожда, докато под влияние на ВАР като единствен растежен регулатор в среда С2, се образува вегетационният връх на растението.



Фиг. 7. Ново растение, образувано върху коренов калус от *C. pseudaxillaris* на среда C2.



Фиг. 8. Растение *C. pseudaxillaris*, регенерирано от коренов калус на среда C2.

Същият процес настъпи и при коренови експланти на среда IP1, съдържаща само цитокинина 2iP в концентрация 1.0 mg/l. Получените на среди C2 и IP1 растения бяха прехвърлени на среди MS и 1/2 MS, където се развиваха нормално (Фиг. 8).

4.3.5.3. Обобщение на резултатите от регенерация чрез индиректна органогенеза

На Табл. 6 са показани обобщените данни, получени при индиректната органогенеза. Тези данни показват, че при изследваните видове е възможна индиректна регенерация на цели растения от листни (а при *C. pseudaxillaris* и от коренови) експланти в хранителни среди със съдържание на цитокинин от 0.5 до 3.5 mg/l, като най-добър резултат дава използването на листа и среда с 1 mg/l BAP.

Табл. 6. Индиректна органогенеза при *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri* и *C. pseudaxillaris*.

* Поради малкия брой растения, не е изчислен РС.

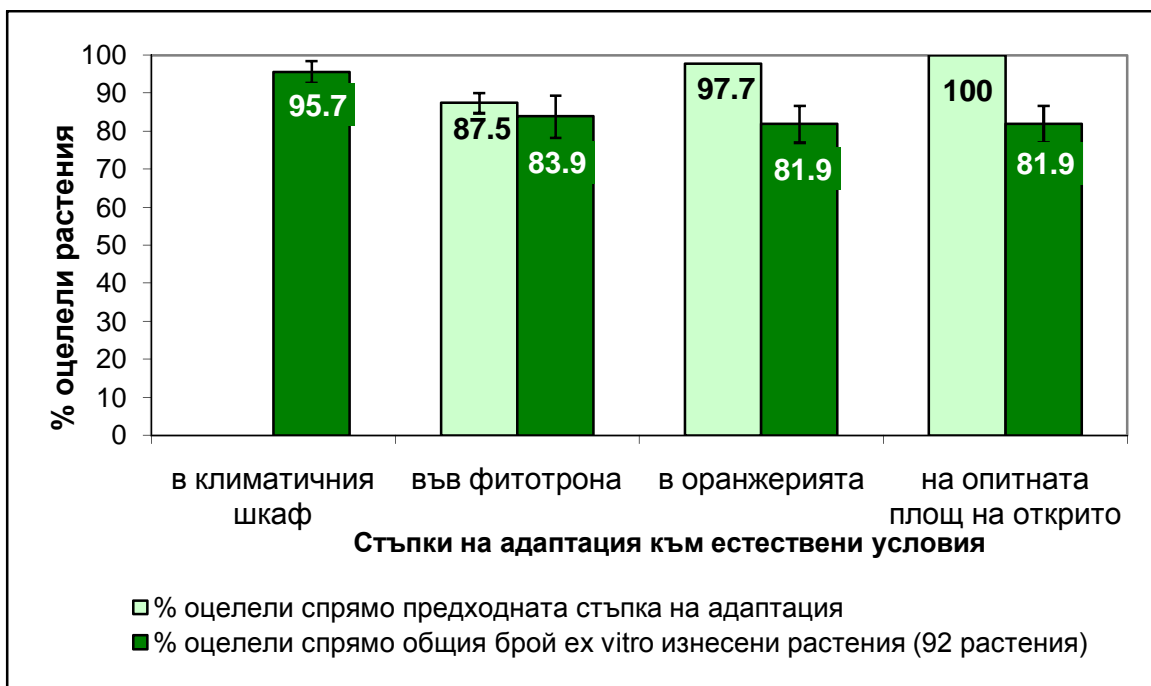
Вид	Експлант	Хр. среда	РС
<i>C. caliacrae</i>	листа	B1	0.75
<i>C. davidovii</i>	листа	B1, C7, C7i, CA2, IP1	0.27 (B1)
<i>C. finazzeri</i>	листа	C7	-*
<i>C. pseudaxillaris</i>	листа	B1	0.23 ± 0.11
	корени	C2	-*
	корени (калус)	IP1	-*

4.4. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация

За разлика от много видове от род *Centaurea*, *C. davidovii*, *C. pseudaxillaris* и *C. caliacrae* образуват корени на основните среди MS и ½ MS. Това значително улеснява процеса на *ex vitro* адаптация, като се имат предвид големите затруднения при други видове, предизвикани от слабо коренообразуване и необходимостта от специални мерки за подобряването му. Същевременно при *C. finazzeri* не беше наблюдавано спонтанно вкореняване на никоя от използваните среди, нито се образуваха жизнеспособни корени на средите N1, N2, I1 и I2, подходящи за вкореняване поради съдържащите се в тях ауксини, съответно 0.5 и 1 mg/l NAA и 0.5 и 1 mg/l IBA.

Първият опит за *ex vitro* адаптация беше проведен с растения *C. caliacrae*. Съдовете с растенията бяха покрити с прозрачно полиетиленово фолио през първата седмица от адаптацията. При следващите опити по *ex vitro* адаптация при *C. davidovii* и *C. pseudaxillaris* беше използван култивационен шкаф с контролирани температура, осветление и влажност. Последният параметър е от най-съществено значение за адаптацията. С помощта на този апарат бяха адаптирани всички останали растения, изнесени в оранжерия и в откритата опитна площ.

При първоначална влажност в апарата между 85% и 90%, преживяемостта беше не по-ниска от 93%. При отглеждането във фитотрона процентът на оцелелите растения *C. davidovii* беше между 80% и 90% (Фиг. 9).



Фиг. 9. Преживяемост при адаптацията на *C. davidovii* в климатичния шкаф и във фитотрона.

През пролетта и лятото на 2013 г. 44 адаптирани растения *C. davidovii* (25 от тях получени на среда C2, 5 – на среда B1 и 14 – на MS) и 13 растения *C. pseudaxillaris* (получени на среда C2)

бяха изнесени от фитотрона и оранжерията и засадени на открито в опитната площ на ИБЕИ-БАН в София (Фиг. 10).



Фиг. 10. *Ex vitro* адаптирани растения *C. davidovii* (ляво) и *C. pseudaxillaris* (дясно) в откритата площ.

Всички растения понесоха добре пресаждането и един месец след него нарастваха и образуваха нови листа. Всички растения *C. pseudaxillaris* цъфнаха, а при *C. davidovii* цъфнаха 20 от 44 растения. Въпреки че експерименталната популация има клонален произход, в нея също има сезонно разделение на генеративни (цъфтящи) и вегетативни (нецъфтящи) индивиди, както в естествените популации.

Цъфналите растения образуваха семена. Тяхната жизнеспособност беше демонстрирана чрез получаването на нови растения *in vitro*; от стерилизираните 31 семена, 3 покълнаха на среда $\frac{1}{2}$ MS без растежни регулатори. Новите растения нарастваха нормално, образуваха корени, и цъфнаха в условия *in vitro* 6 седмици след покълването си. Това показва, че макар да се очаква индивидите в тази популация да имат еднакъв генотип, в нея може да се създаде генетично разнообразие при образуването на семена.

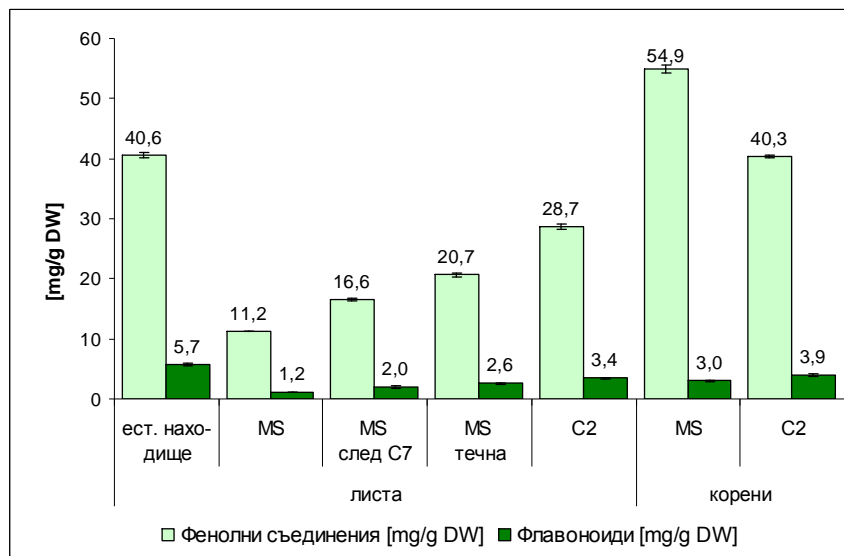
4.4.1. *Ex situ* колекция

От *ex vitro* адаптирани растения и растения, поникнали в почва, беше създадена *ex situ* колекция от растения, отглеждани в оранжерията и откритата опитна площ на ИБЕИ. Колекцията се състои от 13 индивида *C. caliacrae* (адаптирани, получени на среда MS) в оранжерията, 31 индивида *C. davidovii* (адаптирани, получени на среди MS, B1 и C2) в оранжерията, а в откритата опитна площ: 44 индивида *C. davidovii* (адаптирани, получени на среди MS, B1 и C2), 4 индивида *C. finazzeri* (адаптирани, получени на среда C7), 13 индивида *C. pseudaxillaris* (адаптирани, получени на среди B1, C2 и IP1) и 16 индивида *C. trinervia* (получени от семена). Бяха засадени и 19 индивида *C. wagenitziana* (получени от семена) в откритата площ. Поради нападение от акари, съчетано с малкия размер на растенията (семедели и 1-2 листа), *C. wagenitziana* отпадна от колекцията. Всички други растения оцеляха.

4.5. Фитохимичен анализ

Най-ниски стойности на общите фенолни съединения (11.22 mg/g) се наблюдават при растенията отглеждани в MS среда, а най-високи (28.72 mg/g) - при C₂, в която е добавен ВАР.

При корените на *C. davidovii* се наблюдава обратна зависимост – по-високо съдържание на фенолни съединения се регистрира при MS среда и по-ниско в средата, съдържаща ВАР (40.29 mg/g). Най-богати на флавоноиди отново се оказаха листата на *C. davidovii*, в които съдържанието на флавоноиди е 5.74 mg/g, за разлика от това в листата на *C. trinervia* (3.19 mg/g) и *C. finazzeri* (1.64 mg/g). Обобщените данни за съдържанието на фенолни съединения и на флавоноиди при *C. davidovii* са показани на Фиг. 11.



Фиг. 11. Общо съдържание на фенолни съединения и флавоноиди в листа и корени от *C. davidovii* от естественото находище и различни хранителни среди.

Изводи

1. Проведените наблюдения показват, че популациите на изследваните видове са със силно ограничена площ и численост – от няколко десетки индивиди (*C. trinervia*, *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. Mannagettae*, някои от популациите на *C. immanuelis-loewii*) до няколко стотици (*C. diospolitana*, *C. finazzeri*, *C. pseudaxillaris*, *C. wagenitziana*) и обикновено са с групово разпределение на индивидите; единствено популацията на *C. immanuelis-loewii* от 33 „Острица” наброява десетки хиляди индивиди.
2. При повечето видове лимитиращите фактори са тяхната привързаност към специфичен хабитат, разрушаването на местообитанията и слабата репродуктивна способност. Необходими са както *in situ*, така и *ex situ* методи за опазване.
3. Изоензимното изследване показва, че при повечето изследвани популации има силно изразена вътрешнопопулационна изменчивост. Тя свидетелства за наличие на кръстосано опрашване в популациите на изследваните видове, както и че преобладава семенното размножаване.
4. Семенното размножаване е силно затруднено от ниската кълняемост на семената, наблюдавана при всички видове освен при *C. caliacrae*, както и от насекомите, нападащи кошничките на растенията.
5. *In vitro* техниките са подходящи за ускорено размножаване на изследваните видове от род *Centaurea*. Най-подходящият материал за инициране на *in vitro* култура са семената; използването на други части от растението е силно затруднено поради комбинацията от силна заразеност с микроорганизми и голяма чувствителност на растенията към стерилизацията. Семената са най-подходящият стартов материал и от гледна точка на съхраняването на генетичното разнообразие при *in vitro* размножените растения.
6. За поддържане на дълготрайна култура и ускорено микроразмножаване са подходящи директната органогенеза с разделяне на нови регенерирани стъбла и/или индиректната органогенеза с получаване на нови растения от калус; листните експланти имат значително по-голяма регенерационна способност от кореновите на използваните хранителни среди.
7. *Centaurea davidovii* образува сравнително бързо адвентивни стъбла и корени на основната хранителна среда без растежни регулатори, поради което при този вид е по-целесъобразно прилагането на ускорено *in vitro* микроразмножаване чрез директна органогенеза. Индиректната органогенеза от листни експланти е по-подходяща за видове, които нарастват бавно *in vitro*, като *C. caliacrae*, *C. finazzeri* и донякъде *C. pseudaxillaris*.
8. Получените растения при *C. caliacrae*, *C. davidovii* и *C. pseudaxillaris* - както чрез директна, така и чрез индиректна органогенеза - имат нормално развитие, като е наблюдаван и цъфтеж.

При *C. davidovii* цъфтят растения както в *in vitro* култура, така и след *ex vitro* адаптация, а при *C. caliacrae* и *C. pseudaxillaris* – адаптирани растения.

9. Аклиматизираните растения *C. davidovii* образуват жизнеспособни семена в клон-популация, получена *in vitro* чрез вегетативно размножаване от едно покълнало семе.

10. Най-подходяща за покълване на семената е основна MS среда; за получаване на адвентивни стъбла чрез директна органогенеза – среда MS и C2 (с 0.5 mg/l BAP), за регенериране на растения от листни експлантати – среда B1 (с 1 mg/l BAP) и C7 (с 1.4 mg/l BAP и 3.5 mg/l TDZ); за вкореняване на получените розетки – среди MS и 1/2MS. Среда C2 повишава размножителния коефициент. Отговорът на растенията към състава на хранителната среда е видово специфичен; това е най-силно изразено при коренообразуването.

11. За успеха на *ex vitro* адаптацията от най-голямо значение са два фактора: наличието на добре развити корени и контролираното намаляване на влажността на въздуха. При използване на климатичен шкаф в продължение на 3 седмици оцеляват над 90 % от получените растения. Подходящ субстрат за растенията е сместа от торф, пясък и кокосови стърготини. *Centaurea davidovii* се аклиматизира успешно към терен с надморска височина, по-малка с около 1000 м от тази на естественото находище. При *C. pseudaxillaris* е отбелязано образуване на туфи от по няколко нови растения след второто презимуване на засадените на открито *ex vitro* адаптирани растения.

12. Съдържанието на феноли и флавоноиди в листа на *C. davidovii*, *C. finazzeri* и *C. pseudaxillaris* от естествените находища варира и е най-високо при *C. davidovii*.

13. Общото съдържание на фенолни съединения и на флавоноиди при *in vitro* условия се влияе от наличието на BAP в хранителната среда и от растителния орган: листа или корени. В екстракти от листа на *C. davidovii*, отгледани *in vitro*, това съдържание е от два до четири пъти по-ниско в сравнение с тези в листата на растението от естествена популация.

7. Приноси

1. Извършени са популационни наблюдения, установено е състоянието и са картирани 22 популации на 9 от най-редките видове в българската флора (*Centaurea caliacrae*, *C. davidovii*, *C. diospolitana*, *C. finazzeri*, *C. immanuelis-loewii*, *C. mannagettae*, *C. pseudaxillaris*, *C. trinervia* и *C. wagenitziana*); идентифицирани са основните заплахи и лимитиращи фактори; избрани са и са фиксирани площадки за постоянен мониторинг на 8 вида от рода.

2. Установени са две нови популации на два от целевите видове – *C. pseudaxillaris* край с. Добрич, Хасковска обл., и *C. mannagettae* край с. Устрем, Ямболска обл.

3. С цел избор на подходящ растителен материал за *ex situ* опазване чрез биотехнологични методи, за първи път е изследвано семенното размножаване и генетичното разнообразие на 11 популации на *Centaurea davidovii*, *C. finazzeri*, *C. immanuelis-loewii*, *C. mannagettae*, *C. pseudaxillaris*, *C. trinervia* и *C. wagenitziana* и е установено в кои популации има по-висока вътрешнопопулационна изменчивост.

4. Определено е съдържанието на общи феноли и флавоноиди при 3 вида – *Centaurea davidovii*, *C. finazzeri* и *C. trinervia*, в проби от естествените популации и от *in vitro* култура.

5. Създадена е научна основа за *ex situ* опазване чрез *in vitro* култивиране на видове от род *Centaurea* като:

5.1. За първи път са разработени протоколи и са въведени в *in vitro* култура 6 вида с високо консервационно значение от род *Centaurea*: *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri*, *C. pseudaxillaris*, *C. trinervia* и *C. wagenitziana*;

5.2. Получен е за първи път *in vitro* клон от *C. davidovii*, произхождащ от едно семе, размножен до няколкостотин растения за период от 18 месеца, като до момента 75 растения са успешно *ex vitro* адаптирани в лабораторни условия при контролирани температура и осветление, от които 31 растения са в процес на аклиматизация при оранжерийни условия, а 44 растения са аклиматизирани на опитната площ на ИБЕИ на открито, част от тях са достигнали цъфтеж и семеобразуване и са презимували успешно.

5.3. Създаден е протокол за *in vitro* микроразмножаване чрез директна органогенеза при *C. davidovii* и за индиректна органогенеза при *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri* и *C. pseudaxillaris*.

5.4. За първи път е завършен пълният цикъл на *in vitro* култивирането при 4 вида от род *Centaurea*: *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri* и *C. pseudaxillaris* – от стерилизация на изходния материал до аклиматизация на регенерираните растения.

5.5. Създадена е *ex situ* колекция от *C. davidovii* (44 растения), *C. pseudaxillaris* (14 растения) и *C. finazzeri* (4 растения) чрез аклиматизиране на *in vitro* регенерирани растения, и от *C. trinervia* (16 растения) от покълнали в почва семена.

Публикации по темата на дисертацията

1. Bancheva, S., **Gorgorov, R.** 2010. Taxonomic revision and conservation status of *Centaurea davidovii* (sect. *Lepteranthus*, Asteraceae). *Phytol. Balcan.* 16 (2): 255 – 261.

Установени цитати:

1) Daşkın, R., & Kaynak, G. Conservation status of five endemic species distributed in Northwest Turkey. – *Phytol. Balcan.*, 17(2) (2011): 213-219. Print ISSN: 1310-7771, On-line ISSN: 1314-0027.

2) Shabestari, E., Attar, F., Riahi, H. & Sheidai, M. 2013. Seed morphology of the *Centaurea* species (Asteraceae) in Iran. - *Phytol Balcan.*, 19(2) (2013): 209-214. Print ISSN: 1310-7771, On-line ISSN: 1314-0027.

2. **Gorgorov, R.**, Stanilova, M., Bancheva, S. 2011. *In vitro* cultures of Balkan and Bulgarian endemic *Centaurea* species. Proceedings of the 4th International Symposium “New research in biotechnology” USAMV Bucharest, Romania, 2011, pp. 133 – 139.

Участия в конференции с резултати по темата на дисертацията

1. Национална младежка конференция “Биологични науки за по-добро бъдеще”, Пловдив, 19 – 20.10.2012

2. 4th International Symposium “New research in biotechnology” USAMV, Bucharest, Romania, 10. – 11.11.2011.

3. VII Национална конференция по ботаника, София, 29. – 30.09.2011

4. “Биологично разнообразие и жизнена среда”, София, 24. – 25.06.2010

Scientific basis for *ex situ* conservation of rare species of genus *Centaurea* s.l. in Bulgaria

Rossen Gorgorov

PhD thesis abstract

Centaurea s. l. is the genus richest in endemic taxa in the Bulgarian flora. The objects of this PhD thesis are 9 rare and endemic *Centaurea* species native to Bulgaria - *C. caliacrae* Prodán, *C. davidovii* Urum., *C. diospolitana* (Bancheva& Stoyanov) Bancheva, *C. finazzeri* Adamović, *C. immanuelis-loewii* Degen, *C. mannagettae* Podp., *C. pseudaxillaris* Stef. & T. Georgiev, *C. trinervia* Willd. and *C. wagenitziana* Bancheva & Kit Tan. They have a few populations with generally small number of individuals, and are dependent upon their specific habitats. Habitat destruction and low reproductive capacity of these species, mainly due to weak seed germination and damage of seeds by insects, necessitate their conservation both *in situ* and *ex situ*. The objective of the present PhD thesis was to accumulate knowledge for a scientific base for the *ex situ* conservation of the mentioned species and to develop protocols for their *in vitro* cultivation as a means of conservation.

Within the present work, altogether 22 populations of these 9 species were visited and mapped and the data for them in terms of precise location, population size, conservation status, threats and interactions with co-habiting species was updated. The genetic diversity of 13 populations of 7 species was studied by isozyme analysis with 4 enzyme systems. This analysis demonstrated a high intrapopulation variability in most populations which makes all of them a suitable source of material for *ex situ* conservation in order to preserve their genetic diversity. The highest variability was found for phosphoglucosomerase in the two studied populations of *Centaurea mannagettae* – two loci with three alleles each.

Seeds were found to be the best starting material for *in vitro* cultivation with these species, despite the very low germination rate in most of them, with the remarkable exception of *C. caliacrae* (up to 94% germinating seeds). Twenty-five MS-based nutrient media compositions were tested, with or without added auxins and cytokinins in different concentrations.

Centaurea caliacrae and *C. davidovii* germinated, grew and formed roots on the phytohormone-free MS medium. New plants were regenerated also through callus from leaves (*C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri*, *C. pseudaxillaris*) on a medium containing 1 mg/l benzylaminopurine (BAP) or N⁶ – (Δ^2 -isopentenyl)- adenine (2iP) or 1.4 mg/l BAP and 3.5 mg/l thidiazuron (TDZ), and from roots (*C. pseudaxillaris*) on a medium containing 0.5 mg/l BAP. Once regenerated, the plantlets grew normally and rooted on the basal medium. The rooting was problematic only with *C. finazzeri*. A considerably higher propagation coefficient was achieved with adding 0.5 mg/l BAP to the propagation medium; however, this reduced rooting.

Micropropagated plants of *C. caliacrae*, *C. davidovii*, *C. finazzeri* and *C. pseudaxillaris* were successfully adapted *ex vitro* and acclimated to ambient conditions. The quality of the roots and the gradual decrease of humidity were the crucial factors for the adaptation process. With the

use of a climate chamber with programmable temperature, light and humidity, a survival rate of at least 93% was observed. An *ex situ* collection was established with the acclimated plants. They flowered and set seeds after their first winter. Altogether 75 *ex vitro* adapted plants were obtained from a single seed of *C. davidovii*; these plants produced fertile seeds.