

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“

Ива Василева Дойчева

**Биотехнологичен подход
за размножаване на *Glaucium flavum* Crantz.
(Papaveraceae)**

Автореферат

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

Научни ръководители:

доц. д-р Марина Станилова

доц. д-р Стефан Филипов

Научно направление: 4.3. Биологични науки

Научна специалност: 01. 06. 03 Ботаника

София,

2017 г.

Дисертацията се състои от 141 страници, съдържа 36 фигури и 22 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 247 заглавия от които 18 на кирилица и 229 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на Научния колегиум на Отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ на ИБЕИ – БАН на 27.09.2017г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.12.2017 г. от 11:00 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:

проф. д-р Страхил Христов Берков (ИБЕИ-БАН) - председател на НЖ
доц. д-р Марина Иванова Станилова (ИБЕИ-БАН) (научен ръководител)
проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева (БФ-СУ)
доц. д-р Георгина Петкова Костуркова (ИФРГ-БАН)
доц. д-р Антоанета Борисова Трендафилова (ИОХЦФ-БАН)

Материалите по защитата на дисертацията са на разположение в библиотеката на Отдел РГРР на ИБЕИ, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 23, стая 403.

Използвани съкращения:

2,4-D - 2,4-дихлорфеноксиоцетна киселина
BAP – 6-бензиламинопурин
GA₃ – гиберелинова киселина
IAA – β-индолил-3-оцетна киселина
IBA – β-индолил-3-маслена киселина
Kin – кинетин
NAA - 1-нафтилоцетна киселина
PVP – поливинил пиролidon
STS – сребърен тиосулфат (Ag₂S₂O₃)
AB – активен въглен
AK – аскорбинова киселина
Глу – глутамин
ПТСХ – препаративна тънкослойна хроматография
PP – растежен регулатор
SAC – сурова алкалоидна смес
CE – соматична ембриогенеза
TDZ - тидиазурон
ТСХ – тънкослойна хроматография

1. Увод

Glaucium flavum Crantz. е лечебен вид, отличаващ се с високо съдържание на глауцин, алкалоид включен в състава на лекарства с противокашлено действие. Видът е обект на фитохимични и фармакологични изследвания през втората половина на XX век в Източна Европа. В България са провеждани активни изследвания на противокашленото действие на глауцин, на динамиката на неговото натрупване в надземната маса и на цялостния алкалоиден състав на вида. Провеждани са изследвания за получаване на полусинтетични аналози на глауцин, както и опити за установяване на подходящите условия за отглеждане на растението в селскостопанска култура. Интересът към *G. flavum*, като източник на глауцин е запазен. Освен като лечебен вид, *G. flavum* е известен и със своите декоративни качества. Възможно е използването му за рекреация на почви, замърсени с тежки метали.

Естествените находища на вида са подложени на силно антропогенно въздействие.

В България видът е включен в Закона за лечебните растения (2000), а събирането му от естествените местообитания за търговски цели е забранено.

Липсват литературни данни за регенерирането на цели растения от *G. flavum*. С цел решаване на проблема с пазарното търсене на глауцин и недостига на растителен материал е нужен фитохимичен скрининг на естествените находища на вида и разработване на алтернативни на традиционните методи за размножаване. Растителните биотехнологии предоставят богат набор от методи, според видовата специфика, за *in vitro* регенериране на растения от видове с икономическа и консервационна значимост. Чрез биотехнологичните методи е възможно получаването на растения, идентични на изходните, създаване на култури за получаване на вторични метаболити и дори мащабиране на производството.

Възможността за поддържане на контролирани условия и проследяване развитието на растенията в култура, например от соматични ембриони, биха позволили да се осветлят моменти от биосинтезата на апорфиновите алкалоиди и нейното повлияване от абиотичните фактори. Подобни изследвания, освен особено актуални днес, биха намерили практическо приложение в бъдеще.

2. Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е експериментално определяне на подходящите параметри за *in vitro* култивиране и *ex vitro* адаптация на *Glaucium flavum* Crantz., съобразно специфичните изисквания на вида. Предвиден е и сравнителен анализ на съдържанието на глауцин в растения от естествени находища на вида в България, на базата на който да бъдат подбрани изходни находища за бъдещо *in vitro* размножаване.

За постигането на поставената цел бяха планирани следните задачи:

- 1) Събиране на растителен материал (семена и надземна маса) от български популации на *G. flavum* за инициране на *in vitro* култури и за фитохимични анализи;
- 2) Изследване на кълняемостта и жизнениостта на семената и изменението им с течение на времето;
- 3) Инициране на *in vitro* култури;
- 4) Субкултивиране и изследване на видовите особености в условия на дългосрочна *in vitro* култура;
- 5) Изследване влиянието на външните фактори: състав и тип на хранителните среди, условия на култивиране и култивационни съдове;
- 6) Сравнение на ефективността на различни *in vitro* техники за ускорено размножаване;
- 7) *Ex vitro* адаптация при контролирани условия във фитотрон;
- 8) Хистологични наблюдения на *in vitro* култури;
- 9) Определяне съдържанието на глауцин в надземната маса на растения от различни естествени находища.

3. Материали и методи

4.1. Изходен растителен материал

В периода 2013-2015 година през месец юли е събран растителен материал от естествени находища на *G. flavum* от българското Черноморие и край София (Табл. 1).

Използвани са семена и *in vitro* покълнци за инициране на *in vitro* култури.

За фитохимичното изследване е събрана надземна маса от растения във фаза на масов цъфтеж.

Табл. 1. Изходен растителен материал от *Glaucium flavum*.

Находище, GPS координати и надморска височина	Растителен материал и година на събиране		
	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Дуранкулак	-	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Шабла	-	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Шкорпиловци	надземна маса; семена	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Поморие	-	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Созопол	-	семена	-
Аркутино	надземна маса	надземна маса; семена	-
Варвара	надземна маса; семена	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Ахтопол	-	надземна маса; семена	надземна маса; семена
Синеморец	-	надземна маса; семена	надземна маса; семена
София	надземна маса; семена	надземна маса; семена	-
<i>Ex vitro</i>	-	-	надземна маса
Стопански насаждения	-	надземна маса	надземна маса

4.2. Методи

4.2.1. Кълняемост на семената

Кълняемостта на семената е изпитана *in vivo* и *in vitro* при лабораторни условия и е пресметната като процент от заложените семена.

За определяне кълняемостта *in vivo* са използвани семена с произход Варвара, които са поставяни в петриевы блюда с влажна филтърна хартия, по 40 семена в петри, в 5 повторения.

В допълнение е изпитана и кълняемостта на семената в почвен субстрат (почва:бентонит:пясък, 2:1:1) и в пясък.

Изчислено е абсолютното тегло на семена, събрани през 2014 г. от различни находища (Варвара, Шкорпиловци, Синеморец, Поморие, София, Ахтопол, Дуранкулак, Шабла), на базата на 200 бр. семена от находище, по формулата $A = B * 5$, където: А – абсолютно тегло на семената (тегло на 1000 бр. въздушно сухи семена (g)); В – тегло на 200 бр. въздушно сухи семена (g).

При определяне кълняемостта *in vitro*, семената са предварително стерилизирани.

Стерилизираните семена са заложи на агарова хранителна среда B5 (6,5 g/L Plant agar, Duchefa, NL) с 20 g/L захар. Семената са култивирани при температури $8 \pm 2^\circ\text{C}$, $15 \pm 2^\circ\text{C}$, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ на тъмно или при фотопериод 16 ч. светлина/ 8 ч. тъмнина и интензитет на светлината 2000 lx.

Изпитано е влиянието на химични стимулатори на кълняемостта- GA_3 , KNO_3 , K_2HPO_4 приложени в концентрация 0,35%.

Изпитано е влиянието на предварителното съхранение на семена в продължение на три месеца при ниска температура ($8 \pm 2^\circ\text{C}$).

Определени са кълняемата енергия и деня на нейната проява.

Процентът на кълняемата енергия е изчислен по следната формула:

$$KE = \frac{\text{най-голям брой едновременно покълнали семена}}{\text{общ брой заложили семена}} * 100$$

Денят, в който са покълнали най-голям брой семена е означен, като ден на проява на KE.

4.2.2. Жизненост на семената

Жизнеността на семената е оценена чрез тетразолов тест.

4.2.3. *In vitro* култивиране

4.2.3.1. Дезинфекция на изходния растителен материал

Растителният материал (семена, листа, незрели семена, плодове, тичинки и венчелистчета) е стерилизиран чрез последователно третиране със 70% етанол, 50% разтвор на белина „Асе“ (NaClO, Cl <5%) и 2-3 капки „Domestos“. Стерилизанта̀т е отмит чрез трикратно промиване със стерилна дестилирана вода.

4.2.3.2. Хранителни среди

Използвани са основните хранителни среди B5, MS и Anderson, съдържащи макро – и микросоли, витамини и железен хелат (Gamborg et al., 1968; Murashige & Skoog, 1962; Anderson, 1975). Изпитана е и модифицирана B5 среда, с двойно количество макросоли (2B5). Всички среди са втвърдени с добавяне на агар (6,5 g/L Plant agar, Duchefa, NL) и са автоклавираны при 121°C и налягане 1 atm за 20 минути.

Според целта на култивирането, към основните хранителни среди са добавяни различни растежни регулатори, въглеродни източници и други компоненти, които са изпитвани в различни концентрации и комбинации.

За намаляване на ексудатите, в хранителната среда бяха добавяни поотделно или в комбинация следните вещества: активен въглен (1 или 0,5 g/L), аскорбинова киселина (10 mg/L), AgNO₃ (0,5 mg/L), PVP (1 g/L), STS (1; 2 или 5 mg/L), STS и активен въглен (1 или 2 mg/L STS + 0,5 mg/L AB).

За изпитване влиянието на различни въглеродни източници са използвани: захароза (20 и 30 g/L), глюкоза (30 g/L), фруктоза (30 g/L), манитол (30 g/L) и сорбитол (30 g/L) в хранителна среда B5 (Gamborg et al., 1968) с добавен 0,5 g/L активен въглен.

За изпитване въздействието на концентрацията на захарта върху растенията са добавени четири различни концентрации захар (5, 10, 20, 30 g/L) в хранителна среда B5.

4.2.3.3. Условия на култивиране

Изпитано е влиянието на физични фактори (температура, светлина). Изпитаните температури са 8°C и 23±2°C и осветеност - 191 lux и 2500 lux. Растенията са култивирани в контейнери Vitro vent (Duchefa ®, NL), овални Plant culture containers с микрофилтриращи вентилационни дискчета (TQPL, UK) или в стъклени епруветки с диаметър 25 mm.

4.2.3.4. Калусообразуване

За изходен материал за калусообразуването са използвани експланти (котиледони, хипокотили и коренчета) от *in vitro* покълнеци.

Култивирани са на 18 вида хранителни среди (Табл. 2) при температура $23\pm 2^\circ\text{C}$, осветление 3000 lux и фотопериод 16 ч. светлина/ 8 ч. тъмнина. Коренови експланти са култивирани на тъмно, при две различни температури, $23\pm 2^\circ\text{C}$ и $8\pm 2^\circ\text{C}$.

Честотата на калусообразуване е изчислена в проценти, като експлантите, образували калус, са съотнесени към общия брой заложени експланти.

4.2.3.5. Соматична ембриогенеза

За индуциране на индиректна соматична ембриогенеза са използвани коренчета от покълнеци. Те са култивирани на агарова (6,5 g/L Plant agar, Duchefa, NL) MS хранителна среда с 30 g/L захар и добавени шест различни комбинации от PP, при температура $23\pm 2^\circ\text{C}$ и на тъмно. Изпитаните хранителни среди с комбинации от ауксини и цитокинини са представени в Табл. 2.

Получените соматични ембриони са прехвърлени на модифицирана B5 среда, с удвоено количество макросоли и 0,5 g/L активен въглен. Култивирани са при температура $10\pm 2^\circ\text{C}$ и фотопериод 16 ч. светлина/ 8 ч. тъмнина.

Изчислен е коефициентът на размножаване при SE за два произхода растителен материал (Варвара и Шкорпиловци), като броят образувани соматични ембриони е разделен на броя експланти, образували ембриогенен калус.

4.2.3.6. Коренообразуване

За коренообразуване са изпитани хранителните среди: B5 с удвоено количество на макросолите и 0,5 g/L AB; B5 с добавени 0,5 mg/L IAA и 0,5 g/L AB; MS среда с 10 g/L захар и включени 0,2 mg/L IBA, 1,0 mg/L AgNO_3 и 0,5 g/L AB.

4.2.4. Микроскопски наблюдения

Микроскопски наблюдения са правени на ембриогенен калус и соматични ембриони под бинокулярна лупа Krüss и микроскопи Olympus BX 51 (временни микроскопски препарати) и Nikon Eclipse 50i (временни и трайни микроскопски препарати).

Табл. 2. Състав на изпитаните за калусообразуване и соматична ембриогенеза хранителни среди при *G. flavum*.

Озна- че- ние	Основна хр. среда	Растежни регулатори [mg/L]							Допълнител ни компоненти
		2,4-D	NAA	TDZ	BAP	2iP	Zeatin	Kin	
C1	MS	1,0		0,5					
C2	MS	1,0		0,5	0,1				
C3	MS	1,0		0,5	0,2				
C4	MS	1,0		0,5		0,1			
C5	MS	1,0		0,5			0,1		
C6	MS	2,0		0,5	0,1				
C7	MS	1,0		0,5	0,1				0,5 g/L глутамин
C8	MS	1,0		0,5	0,1				1,0 g/L KX
C9	MS	1,0	0,1	0,5					
C10	MS		1,0		0,5				
C11	MS	0,5						0,1	
C12	MS		0,2		1,0			0,1	
C13	MS		0,2		1,0			1,0	30g/L манитол
C14	MS		2,0					0,25	
C15	MS	1,0	0,1					0,5	
C16	MS	1,0		0,5				0,1	
C17	MS	2,0		0,5					
C18	B5	1,0		0,5	0,1				0,5 g/L AB

4.2.5. Ex vitro адаптация и аклиматизация

Растенията са засаждани в саксии (диаметър 8,5 cm) с почвен субстрат, съставен от 1 част почвена смес (съдържаща торф, пясък, кокосови стърготини и тор от калифорнийски червеи), 1 част пясък и 1 част бентонит.

Адаптацията е двустепенна: в култивационен шкаф (POL-ЕКО Арагатура, PL) и в стаен фитотрон. Условиата в култивационния шкаф са с контролирани температура, осветление, вентилация и влажност на въздуха (постепено намалявана от 90% до 55%).

След адаптацията в култивационния шкаф растенията са отглеждани във фитотрон с температура 16 - 29°C, влажност 25 – 60% и комбинирано осветление от слънчева и изкуствена светлина.

Аклиматизацията е извършена в оранжерията на ИБЕИ. След този период са засадени в опитна площ на открито в с. Мрамор.

4.2.6. Фитохимичен анализ

За всяко от изследваните естествени находища е анализирана средна проба от надземна растителна маса от растения в масов цъфтеж. Анализът е направен в три последователни години: 2013 г., 2014 г. и 2015 г. (Табл. 1). Анализирани са средни проби и от стопански насаждения и от *ex vitro* растения.

4.2.6.1. Хроматографски методи

За изолиране на алкалоидите в настоящото изследване са използвани следните хроматографски техники и материали:

✓ ТСХ върху готови алуминиеви плаки със силикагел (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) и подвижна фаза петролев етер:хлороформ:ацетон:метанол (4:4:1:1).

✓ ПТСХ върху ръчно изработени плочи – стъклени плаки (20 x 20 cm) със силикагел (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck). Използвани са подвижни фази: петролев етер:хлороформ:ацетон:метанол (4:4:1:1) (А) и (2:8:1:3) (Б).

Проявяването на хроматографските плаки се извършва с реактив на Драгендорф.

Използвана апаратура и идентифициране на алкалоидите:

✓ Газов хроматограф с мас детектор: апарат Hewlett Packard 6890/MSD5973, 70eV, HP-5 MC колона (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), температурна програма от 50 до 300°C при 4 °C min.⁻¹ и 10 min. задържане при 300°C, температура на инжектора 280°C, дебит на газа носител (He) – 0.8 ml min.⁻¹. Алкалоидите са определени чрез сравняване на маспектралните им данни с тези от литературата и база данни Wiley 275®.

4.2.6.2. Екстракция на алкалоидите

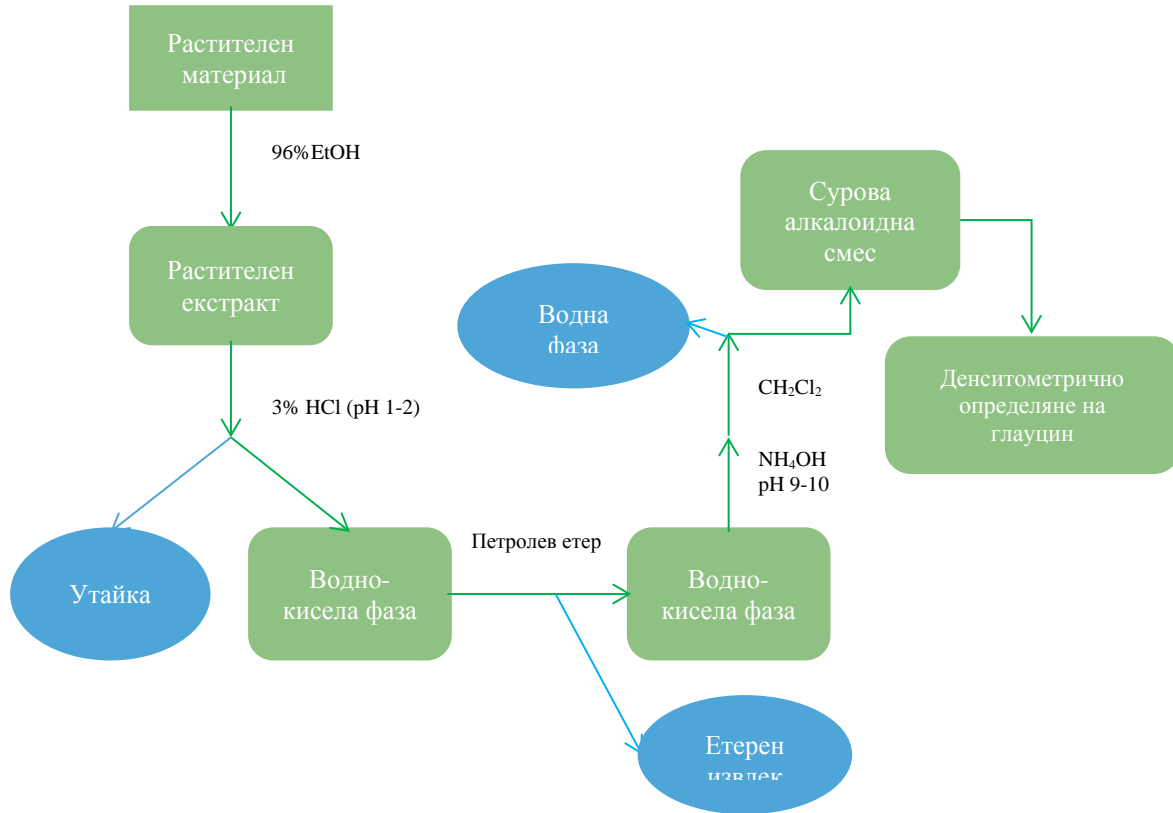
Разработването на растителния материал е обобщено на Фиг. 1.

4.2.6.3. Тънкослойна хроматография и денситометрично определяне на глауцин

На хроматографски плаки (Alufolio Kieselgel 60 F₂₅₄) са нанесени по 3 μl от всяка проба в три повторения. Използвана е подвижна фаза А. Алкалоидите върху плаките са визуализирани чрез напръскване с реактив на Драгендорф. Количественото определяне на глауцин в САС в проценти е направено с денситометрична програма Quanti Scan from Biosoft (2004).

4.2.7. Статистически анализ

За проверка на достоверността на разликите между вариантите е направена статистическа обработка на данните чрез ANOVA single factor и ANOVA two-factor with replication.



Фиг. 1. Схема на разработване на растителния материал.

5. Резултати и обсъждане

5.1. Събиране на растителен материал

Установените различия между първоначално избраните находища (Шкорпиловци, Аркутино Варвара и София), по отношение на кълняемостта на семената и по съдържанието на глауцин, наложиха разширяване на изследваните находища по българското Черноморие. Събран бе растителен материал за фитохимичен анализ на алкалоидите от всички известни и потвърдени от нас находища, с цел актуализиране и допълване на информацията.

Установено бе, че находищата се различават съществено по площ и числеността на растенията в тях. Различия бяха отчетени и по отношение на субстрата – дюни, черноземна и алувиална почви.

5.2. Кълняемост на семената

5.2.1. Абсолютно тегло на семената и оцветяване на семенната обвивка

Семената на *G. flavum* са разположени в цилиндрични, прави или дъговидно извити кутийки. Те са с полукръгла до бъбрековидна форма, тъмно кафяви до черни на цвят, с неравна повърхност и плитки вдлъбнатини. Цветът на семената, събрани от повечето находища на *G. flavum*, беше тъмно кафяв до черен. От събраните край Шкорпиловци, Шабла, Синеморец и София семена бяха забелязани такива с изцяло или частично метално сив цвят. С най-голямо абсолютно тегло от всички изследвани произходи са семената събрани от находището край София (1,215 g), а от тези по българското Черноморие, семената събрани край Поморие (1,140 g). Най-ниско абсолютно тегло бе отчетено за семената събрани край Шкорпиловци (0,880 g).

5.2.2. Влияние на абиотичните фактори температура и светлина върху кълняемостта в *in vitro* условия. Взаимодействие с третиране с GA₃.

При изследване кълняемостта на семена от *G. flavum*, събрани от три находища на вида – Шкорпиловци, Варвара и София, бе установена нейната зависимост от абиотичните фактори светлина и температура.

При температура 23±2°C и светлина с фотопериод 16/8 ч. при нетретираните семена (контролна проба) кълняемост липсва.

Третирането на семената с GA₃ стимулира в слаба степен покълването на семената от Шкорпиловци (10,00%) и София (22,00%) и значително повече семената с произход Варвара (76,00%).

При покълване на семената при ниска температура (8°C) на тъмно, бе отчетен висок процент на кълняемост при контролните и при

третираните с GA₃ семена. При контролата на Шкорпиловци кълняемостта бе най-ниска (Табл. 3). При тези абиотични условия покълването е забавено.

Покълването на семената при ниска температура (8°C) и наличие на светлина (16/8 ч. фотопериод) е затруднено при семената от Шкорпиловци и при контролните семена от Варвара (Табл. 4), което предполага инхибиращ ефект на светлината. При семената и от трите находища бе отчетен удължен период на покълване.

Независимо от високите проценти на кълняемост при ниската температура, тя е неблагоприятна за покълването на семената на *G. flavum*, поради удължения период на покълване, който е следствие на по-ниската кълняема енергия на семената при тази температура. Светлината засилва влиянието на ниската температура, като допълнително забавя и потиска покълването.

При обобщаване на резултатите статистически бе доказано инхибиращото влияние на светлината за покълването на семената, при температура 8°C (P = 0,01) (Фиг. 2).

При температура от 15°C, на тъмно, са отбелязани най-високите проценти на кълняемост и на кълняема енергия и за трите изследвани находища. Периодът на покълване е 14-38 дни, като семената и при трите находища покълват дружно (Табл. 5, Фиг. 3).

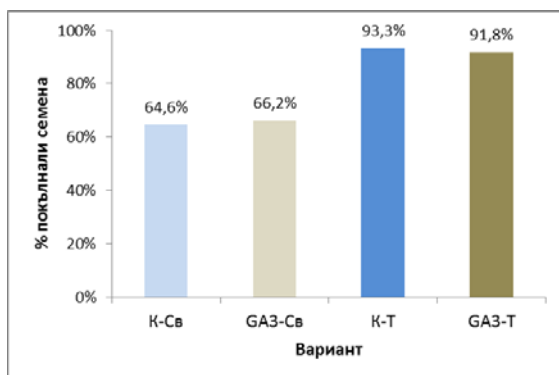
От изпитаните три температурни стойности (8°, 15°, 23°C) оптимална е 15°C на тъмно.

Табл. 3. Кълняемост на семена от три произхода, нетретиранни (контрола) и третиранни с GA₃, при температура 8°C, на тъмно.

Находище	8°C, тъмно			
	Контрола		GA ₃	
	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)
Шкорпиловци	60,00	65-108	92,68	50-108
Варвара	90,00	48-118	84,00	37-90
София	80,00	22-58	90,70	26-48

Табл. 4. Кълняемост на семена от три произхода, нетретираны (контрола) и третираны с GA₃, при температура 8°C и фотопериод 16/8 ч.

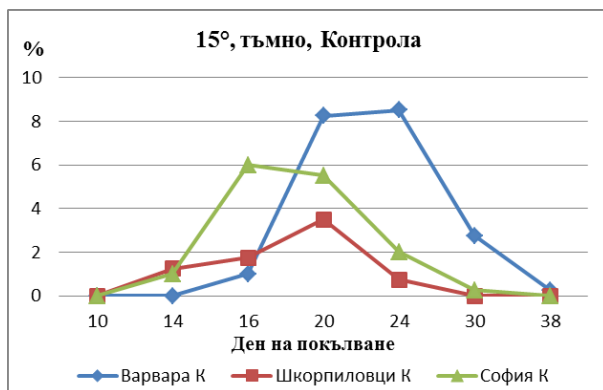
Находище	8°C, 16/8 фотопериод			
	Контрола		GA ₃	
	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)
Шкорпиловци	36,96 ± 27,67	27-121	23,09 ± 6,94	36-133
Варвара	63,08 ± 23,93	93-225	82,23 ± 8,81	36-198
София	93,83 ± 3,06	36-114	93,24 ± 3,32	36-93



Фиг. 2. Влияние на светлината върху покълването на семената при 8°C (обобщени резултати от 738 семена от три находища).

Табл. 5. Кълняемост на семена от три произхода, нетретираны (контрола) и третираны с GA₃, при температура 15°C, на тъмно.

Находище	15°C, тъмно			
	Контрола		GA ₃	
	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)	Кълняемост (%)	Период на покълване (дни)
Шкорпиловци	65,67 ± 2,92	14-24	79,29 ± 3,06	14-30
Варвара	96,86 ± 3,89	16-38	88,26 ± 8,41	16-38
София	100,00 ± 0,00	14-30	100,00 ± 0,00	14-20



Фиг. 3. Динамика на покълването на семена от три произхода, при 15°C на тъмно

5.2.3. Стимулиране кълняемостта на семената

Проследено бе влиянието, върху кълняемостта на семената, след третирането с три химични стимулатори – GA_3 , KNO_3 , Kin , в концентрация 0,35% при температура 15°C, на тъмно. Химичните стимулаторите KNO_3 , Kin , GA_3 не оказват стимулиращ ефект върху покълването на семената от повечето находища, вследствие на благоприятните стойности на абиотичните фактори (15°C на тъмно) при които са заложени семената. Единствено при семената от Шабла и от Варвара, третирането с KNO_3 и при семената от Шкорпиловци, третирането с GA_3 , оказват значим стимулиращ ефект.

Установено е влияние на факторите, свързани с находищата (екологични условия, почва и др.) върху кълняемостта на семената ($P < 0,001$), както и тяхното взаимодействие с химичните стимулатори ($P = 0,01$, ANOVA two-factor with replication). Влиянието на факторите, свързани с находищата, е определящо по отношение влиянието на стимулатора.

Предварителното съхраняване на семената на сухо, при ниска температура (6-8°C) за период от 3 месеца, не стимулира тяхното покълване (нетретираните семена не покълнаха при 23°C, 16/8 ч. фотопериод). Третирането с GA_3 , преди култивиране, на съхранявани при 6-8°C семена, стимулира покълването им. Но процентът на покълналите семена остана по-нисък от този на семената, съхранявани при стайна температура.

5.2.4. Проследяване на кълняемостта в зависимост от срока на съхранение и възможности за стимулирането ѝ

Кълняемостта на семената, с произход Варвара, намалява слабо при увеличаване срока на тяхното съхранение от половин до 2,5 години от датата на събирането им (0,5 год. - 85,84%; 1,5 год. – 85,53%; 2,5 год. 80,00%). Стимулирането на кълняемостта на семена, съхранявани до 2,5 год., бе най-успешно при използване на GA₃.

5.2.5. Жизненост на семената

При сравняване на процентите на жизнените и на *in vitro* покълналите семена от три произхода – Варвара, Шкорпиловци и София, се установява, че *in vitro* условията благоприятстват реализирането на кълняемост, близка до процента на жизнените семена.

5.2.6. Изследване кълняемостта на семената при *in vivo* условия

Определена бе кълняемостта *in vivo*, в петрита с навлажнена филтърна хартия, на семена, събрани през 2012 г. от Варвара, през първата година от събирането им. Кълняемостта на тези семена бе 92,00% ± 4,11. След период на съхранение от две години и половина процентът на кълняемостта се запази висок – 92,50±9,57, при оптималната за покълването на семената температура (15°C) и на тъмно.

Изследването за *in vivo* кълняемостта на семена върху два вида субстрат - пясък и почва, бе проведено със семена от находището край Варвара, събрани през 2012 и 2013 г. Кълняемостта на семена, събрани през 2012 г., в почва бе 19%, а в пясък 22%. Семената събрани през 2013 г. имаха кълняемост 10%, заложи в пясък. В *in vitro* условия, бяха отчетени 85,84% и 90,00% кълняемост за събраните, съответно през 2012 г. и 2013 г., семена от Варвара.

5.3. Калусообразуване и соматична ембриогенеза

5.3.1. Калусообразуване

Сравнено е значението за калусообразуването на три типа експланти (хипокотили, семедели и корени), при четири различни комбинации от PP (C2, C10, C11, C12; Табл. 6).

Табл. 6. Честота на калусообразуването, според приложените растежни регулатори и експлант.

Среда и тип експлант	Растежни регулатори [mg/L]					Калусообразуване [%]		
	2,4-D	NAA	TDZ	BAP	Kin	Корени	Семедели	Хипокотили
C2	1,0		0,5	0,1		100,0%	100,0%	42,9%
C10		1,0		0,5		100,0%	71,4%	60,0%
C11	0,5				0,1	0,0%	6,3%	0,0%
C12	0,2			1,0	0,1	14,3%	0,0%	3,1%

От всички заложени експлант най-голям брой образуват калус при култивирането им на хранителни среди C2 и C10. При тези две среди, калус се образува по цялата повърхност на всички заложени коренови експлант, а отделянето на ексудати от корените е слабо. Калусът е много по-обилен при кореновите експлант, култивирани на среда C2. При котиледоните и хипокотилите калус е наблюдаван само по наранената повърхност на експлантите. При тях е отчетено и силно отделяне на ексудати, което предизвиква некротизиране на тъканите и инхибира калусообразуването.

Корените на покълнеците са най-подходящите експлант за индуциране на калус при *G. flavum*.

При култивиране само на корени на хранителни среди C1 – C9 (Табл. 2.) калус бе образуван при 100% от заложените експлант.

Силно отделяне на ексудати и липса на калус бяха установени при използването на листни сегменти от *in vitro* растения, и листни експлант, незрели семена, сегменти от плодната кутийка, тичинки, венчелистчета и листни дръжки, произхождащи от *ex vitro* адаптирани растения.

Условията на култивиране повлияват калусообразуването, периода на неговото образуване и качеството на калуса. Ниската температура ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$) забавя калусообразуването, а полученият калус е твърд и възлест. Рехав калус, който е подходящ за последващи експерименти за СЕ, бе получен на среда C2 за 6 седмици при температура $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

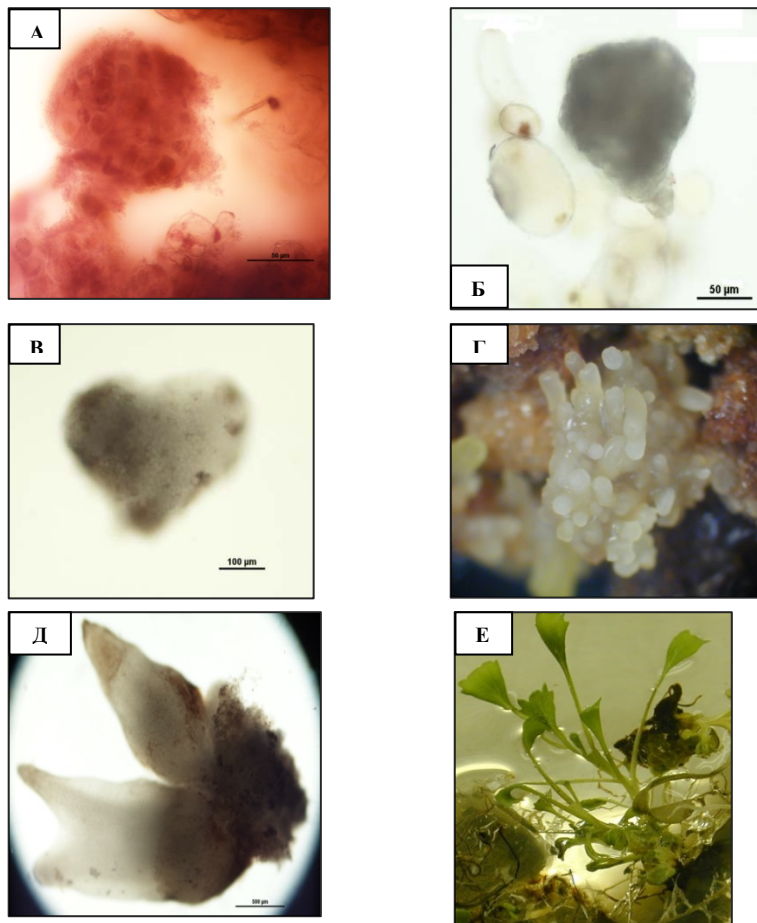
5.3.2. Соматична ембриогенеза

Ембриогенен калус се формира на 100% от заложените коренови експлант при седем комбинации от РР (среди C1, C2, C3, C4, C5, C8, C9), но при повечето среди (C1, C2, C4, C5, C8, C9) соматични ембриони се образуваха само върху единични експлант.

Най-голям брой соматични ембриони бяха получени на среда C3, която включва 1 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L TDZ и 0,2 mg/L BAP.

За експеримента за индуциране на индиректна соматична ембриогенеза са използвани среда С3 и експланти коренчета от *in vitro* покълници с произход Шкорпиловци и Варвара.

В култура бяха наблюдавани всички фази на соматичната ембриогенеза: пре-глобула със суспензор, глобула, сърце, торпедо и котиледонна фаза (Фиг. 4).



Фиг. 4. Фази на развитие на соматичните ембриони: **А)** Пре-глобула със суспензор; **Б)** Глобула, вляво от нея, калусни клетки; **В)** Сърце; **Г)** Торпедо; **Д)** Котиледонна фаза; **Е)** Поници развили се от соматични ембриони.

Честотата на ембриогенния калус, формиран от корени с произход Шкорпиловци и Варвара, се различава значимо ($P = 0,01$). При 13 калуса (43,3%) с произход Шкорпиловци е наблюдавана СЕ. В експеримента с коренчета от Варвара, соматични ембриони са наблюдавани при 11,6% от експлантите (Табл. 7).

Табл. 7. Ембриогенен калус и соматични ембриони при *G. flavum*, получени на среда С3 (1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L TDZ + 0,2 mg/L BAP)

Находище	Брой коренови експланти	Калусо-образуване [%]	Експланти образували ембриогенен калус [%]	Брой соматични ембриони	Коефициент на размножаване
Шкорпиловци	30	100,0%	43,33 ± 0,12 ^a	211	17,22 ± 5,71
Варвара	35	100,0%	11,62 ± 0,06 ^b	68	17,17 ± 0,76

Средните стойности, обозначени с различни букви, се различават значимо, при $P=0.01$ (еднофакторен ANOVA анализ)

Индиректно получените соматичните ембриони от *G. flavum*, покълнаха и се развиха в растения (Фиг. 4-Е) на среда В5 с двойно количество макросоли без PP, съдържаща 0,5 g/L АВ. Поради формирането на ембрионите в групи, при покълването на растенията, някои от тях оставаха свързани. Индукцията на соматична ембриогенеза при *G. flavum* се съобщава за първи път. Успешната регенерация на растения при този вид е първа стъпка към неговото култивиране *in vitro* и основа за по-нататъшни изследвания върху вида, с цел преодоляване трудностите при поддържането му в култура.

5.4. Органни култури

5.4.1. *In vitro* култивиране на стъблени експланти от *G. flavum*

Покълнеци от *G. flavum* бяха култивирани на основни хранителни среди MS (Murashige & Skoog, 1962), Anderson (1975), B5 (Gamborg et al. 1968) и на модифицираните хранителни среди: MS с включени витамини B5; B5 среда с витамини MS.

Хранителна среда B5 се показва най-подходящата за култивиране на *G. flavum*. При култивиране на нея растенията видимо изглеждаха най-свежи, нарастваха и се развиваха добре. Листата имаха интензивен зелен цвят.

5.4.1.1. Въздействие на избрани агенти за намаляване на ексудатите в средата и ограничаване действието на етилена

Проблеми, възпрепятстващи успешното *in vitro* култивиране на *G. flavum*, са отделянето на ексудати в средата, предизвикващо почерняване и некроза на стъблото, пожълтяване и загиване на по-старите листа и епинастията при растенията. За намаляване на фенолните съединения, отделяни в средата, са приложени активен въглен, аскорбинова киселина, PVP, STS, AgNO₃.

Най-добро влияние върху състоянието на растенията бе отчетено при култивирането им в среда с АВ. В такава среда липсваше покафеняване в основата на стъблата, а растенията оставаха твърди, здрави и зелени.

5.4.1.2. Влияние на различни концентрации на макросолите и наличието на активен въглен в средата

Растенията, култивирани на В5 без активен въглен, имат светло зелени до жълтеникави на цвят листа с по-малки размери. Имат предимно по четири свежи листа. Най-старите листа изсъхват.

Растенията на хранителна среда 2В5 (удвоено количество на макросолите) с добавен активен въглен (0,5 g/L) имат светло зелени листа, предимно пет на брой. Растенията нарастват, образуват нови зелени листа, а изсъхването на по-старите е значително забавено.

5.4.1.3. Влияние на различни въглеродни източници – захароза, глюкоза, фруктоза, манитол и сорбитол, в хранителна среда 2В5 с добавен 0,5 g/L активен въглен

Поради липсата на морфологични различия в растенията, култивирани на захар, глюкоза и фруктоза и поради по-ниската цена и достъпност на захарта, като най-подходящ за култивиране въглероден източник се препоръчва именно захарта.

Включването на манитол и сорбитол в средата за култивиране повлия пагубно на растенията.

5.4.1.4. Влияние на различни концентрации на захар (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L) върху развитието на растенията

Растенията, култивирани на среда с 5 и 10 g/L захар, имат тънки стъбла, листа с издължени листни дръжки и жълти петури. Култивирани на среда с 20 и 30 g/L, растенията са видимо по-свежи, със зелени листа, овласинени петури и твърди стъбла, като последното е особено изразено при 30 g/L

Концентрацията на захар избрана, като най-подходяща за култивиране на *G. flavum* е 20 g/L. Това е концентрацията използвана като базова при В5 хранителната среда.

5.4.1.5. Влияние на съдовете за култивиране

При култивиране в затворени съдове възниква сериозен проблем с епинастия на растенията, хиперхидрификация, удължени листни дръжки и забавен растеж. При култивиране на растенията в стъклени епруветки има движение на въздуха и по-ниска въздушна влажност, в резултат, епинастия не е наблюдавана, растенията са гъсто овласинени, а листните дръжки са къси.

5.4.1.6. Влияние на температурата на култивиране

При ниска температура ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$) растенията, култивирани на 2B5 с 0,5 g/L АВ и B5 без АВ, нарастват слабо на дължина за едномесечен период.

При $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ температура, култивирани на 2B5 с 0,5 g/L АВ и на B5 без АВ, растенията се развиват по-бързо, но и листата пожълтяват за по-кратък период, като броят на покафенелите и вече изсъхнали листа е голям. Изпитаните температури вероятно са суб- и супраоптимални за растежа и развитието на *G. flavum*, съдейки по слабия растеж на растенията и по литературните данни, относно други видове от сем. Paraveraceae.

5.4.2. Директна органогенеза

Прилагането на растежни регулатори в хранителната среда не повлиява благоприятно развитието на *G. flavum* в *in vitro* култура.

Малък брой аксиларни стъбла бяха отбелязани при растения, култивирани при B5 с 1 mg/L ВАР, 0,1 mg/L ИВА и 20 mg/L АК и B5 с 0,2 mg/L ВАР и 0,1 mg/L ИВА. Стъблообразуване бе констатирано при растения, които са били предварително култивирани на среда с включени Кin и NAA, което предполага наличието на последствие при комбиниране на тези РР.

5.4.3. Допълнително изпитани методи за *in vitro* култивиране на *G. flavum*

При опитите за индуциране на **индиректна органогенеза** бе наблюдавано образуване на малък брой (1-2 бр.) меристемоиди, които в процеса на култивиране не се развиха в стъбла. Направен бе опит за култивиране на изолирани **зиготични ембриони** от *G. flavum*, но развитите се растения се характеризираха с малки размери и слаб растеж.

5.5. *In vitro* коренообразуване и *ex vitro* адаптация

5.5.1. *In vitro* коренообразуване при *G. flavum*

Коренообразуване в *in vitro* условия бе забелязано при малък брой растения, култивирани на хранителна среда B5 с удвоена концентрация на макросолите, 20 g/L захар и 0,5 g/L активен въглен. Растенията, образували корени, бяха получени от покълнели с отрязани корени и култивирани на посочената среда.

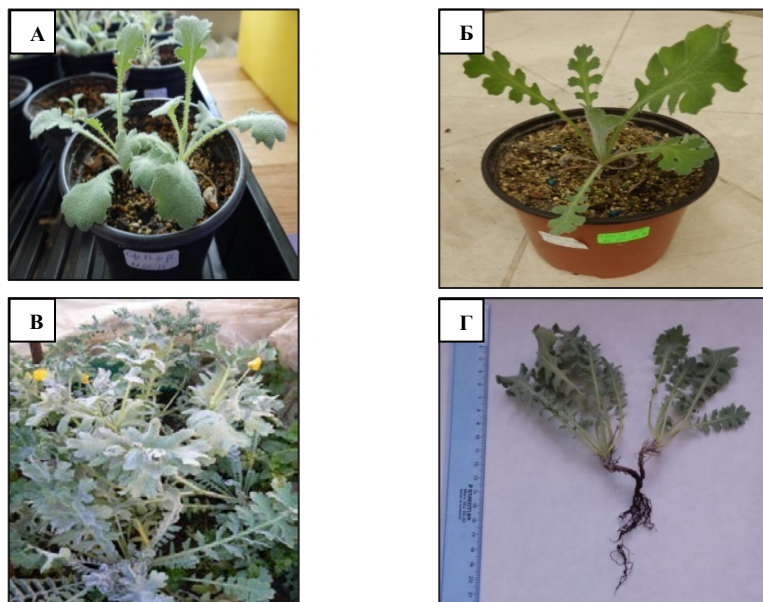
5.5.2. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация на *in vitro* покълнали растения *G. flavum*

За адаптация бяха заложени общо 65 *in vitro* покълнали и 11 *in vitro* регенерирани, чрез СЕ, растения от *G. flavum* (Фиг. 5).

Намаляването броя на растенията, през етапите в климатичен шкаф, фитотронно помещение и оранжерия, се дължи на преовлажняване на почвения субстрат и затруднена адаптация (Табл. 8, Табл. 9).

Средно, крайният процент на адаптираните и аклиматизирани *ex vitro* растения е около 50%.

При растенията, получени чрез СЕ, допълнителен проблем за *ex vitro* адаптирането е, че има заплитане и срастване на корените при повечето растения. (Фиг. 5-Г).



Фиг. 5. *Ex vitro* адаптирани (А, Б) и аклиматизирани (В) растения. Преплитане на корените при *ex vitro* адаптирани растения, регенерирани чрез соматична ембриогенеза (Г).

Табл. 8. *Ex vitro* адаптация на *in vitro* покълнали и *in vitro* регенерирани, чрез соматична ембриогенеза, растения от *G. flavum*.

Произход	Растения заложи в климатичния шкаф (бр.)	Оцелели в климатичния шкаф (бр.)	Оцелели във фитотрон, I етап (бр.)	Краен процент адаптирани растения	Оцелели във фитотрон след 2 пъти пресаждане, II етап (бр.)	Краен брой растения
Аркутино	14	12	4	28,57	3	1
Созопол	18	16	7	38,89	4	4
Шкорпиловци	8	4	4	50,00	4	4
Соматична ембриогенеза	11	11	3	27,27	3	3

Табл. 9. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация на *in vitro* растения от *G. flavum*.

Произход	Растения заложи в кл. шкаф (бр.)	Оцелели в кл. шкаф (бр.)	Оцелели във фитотрона (бр.)	Оцелели в оранжевията (бр.)	Оцелели в откритата площ след 1 год. (бр.)	Брой растения в откритата площ през 2 год.	Аклимат. растения (%)
Варвара	9	7	7	6	6	4	44,44
Шкорпиловци	7	7	6	4	4	3	42,86
София	9	7	7	6	6	6	66,67

5.6. Фитохимичен анализ

5.6.1. Съдържание на суровата алкалоидна смес и на алкалоида глауцин в проби от естествените находища на *G. flavum*

Резултатите от проведения фитохимичен анализ на растителния материал, събран в три последователни години, са представени като процентно съдържание на САС в надземната маса, процентно съдържание на глауцин в САС и процентно съдържание на глауцин в изследваната растителна субстанция.

От изследваните през 2013 г. находища с най-високо процентно съдържание на глауцин в надземната маса се открояват Варвара и Аркутино (Табл. 10).

През втората година – 2014, бе разширен броят на находищата, планирани за изследване. Добавени бяха Дуранкулак, Шабла и Поморие, Ахтопол и Синеморец.

Табл. 10. Процентно съдържание на глауцин и на САС в растителен материал от *Glaucium flavum*.

Находище	Количество екстрахиран материал (g)			САС в изследвания материал (%)			Глауцин в САС (%)			Глауцин в изследвания материал (%)		
	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015
Дуранкулак		15,11	18,03		2,33	1,95		43,59 ± 2,93	72,50 ± 2,05		1,02 ± 0,07	1,41 ± 0,04
Шабла		18,01	18,01		2,76	2,23		75,99 ± 3,07	68,10 ± 1,41		2,10 ± 0,08	1,52 ± 0,03
Шкорпиловци	18,00	18,52	18,00	1,42	1,85	1,74	31,20 ± 4,09	47,78 ± 2,79	36,47 ± 4,82	0,44 ± 0,06	0,88 ± 0,05	0,64 ± 0,08
Поморие		11,02	18,01		3,03	3,37		74,19 ± 1,66	59,36 ± 1,25		2,25 ± 0,05	2,00 ± 0,04
Аркутино	18,03	6,79		2,75	2,76		70,20 ± 3,63	78,75 ± 4,13		1,93 ± 0,10	2,17 ± 0,11	
Варвара	18,00	16,66	18,01	2,69	2,90	1,74	74,20 ± 4,82	68,35 ± 1,07	47,21 ± 1,36	2,00 ± 0,13	1,98 ± 0,04	0,82 ± 0,02
Ахтопол		14,97	8,35		2,96	4,03		68,74 ± 1,23	58,08 ± 2,29		2,03 ± 0,04	2,34 ± 0,09
Синеморец		12,49	18,04		3,43	3,15		60,62 ± 4,05	50,50 ± 1,48		2,08 ± 0,14	1,59 ± 0,05
София	18,00	17,12		2,12	2,80		70,20 ± 5,40	64,84 ± 0,62		1,49 ± 0,11	1,81 ± 0,02	
Шкорпиловци <i>ex vitro</i>			18,03			1,29			36,39 ± 3,72			0,47 ± 0,05
Варвара <i>ex vitro</i>			18,03			0,95			52,83 ± 1,89			0,50 ± 0,02
София <i>ex vitro</i>			18,03			1,41			52,82 ± 0,49			0,74 ± 0,01
Насаждения		11,09	18,01		1,67	1,66		55,03 ± 2,03	58,56 ± 15,01		0,98 ± 0,04	1,03 ± 0,54

Находищата Поморие и Ахтопол поддържат най-високо процентно съдържание на глауцин в растителния материал през 2014 и 2015 г. (Табл. 10).

Най-ниско процентно съдържание на глауцин в надземната маса през трите изследвани години е установено в растителния материал от Шкорпиловци. В това находище глауцинят не е основен алкалоид и неговото количество е почти равно на това на друг алкалоид - изокоридин.

5.6.2. Съдържание на суровата алкалоидна смес и на алкалоида глауцин в проби от *ex vitro* адаптирани растения от *G. flavum*

При сравняване на процентното съдържание на глауцин в *ex vitro* адаптирани и развивали се при естествени условия растения от два произхода (Шкорпиловци, Варвара) бе установено, че *ex vitro* растенията имат по-ниско процентно съдържание на глауцин, в резултат на общо намаленото количество на биосинтезираните алкалоиди в растителния материал.

5.6.3. Хемотипове на *G. flavum*

Проведеният фитохимичен анализ на алкалоидното съдържание на вида показва, че в България са разпространени три хемотипа (Табл. 11).

Табл. 11. Алкалоиден профил на четири находища на *G. flavum*.

Алкалоиди	Находище			
	София %	Варвара %	Шкорпиловци %	Дуранкулак %
Апорфини				
Глауцин	79,48	83,23	23,74	55,77
Изокоридин	0,50	0,13	43,44	0,52
Изоболдин	1,67	0,83		1,01
N-Ме-секоглауцин	1,29	1,09	5,43	1,00
Норглауцин	0,79	0,50		
Дехидроглауцин	12,28	10,23	4,36	14,84
Протопини				
Алокриптопин	0,34	0,50		
Протопин	3,65	1,20	3,41	2,99
Морфинани				
Салутаридин				22,41

Първият хемотип съдържа апорфини и протопини с главен алкалоид глауцин. Находищата край София и Варвара са част от този хемотип, въпреки че Варвара е край морето, а София е във вътрешността на страната. Вторият хемотип също съдържа апорфинови и протопинови алкалоиди, но с главен алкалоид изокоридин и към него принадлежи находището край Шкорпиловци. Третият хемотип съдържа освен апорфини и протопини, и морфинановият алкалоид салутаридин. Находището край Дуранкулак е определено към този хемотип.

6. Изводи

1. Кълняемостта на семената от *Glaucium flavum* варира при лабораторни условия и зависи съществено от абиотичните фактори светлина и температура. Светлината инхибира кълняемостта при най-ниската изпитана температура (8°C). Ниската температура забавя покълването им и удължава периода на покълване. Най-благоприятните температура и светлинен режим за покълване са 15°C, на тъмно.
2. Химичните агенти (GA₃, KNO₃ и Kin) не оказват стимулиращ ефект върху кълняемостта на семената при оптималните условия на покълване (15°C, тъмнина). При неблагоприятните стойности на температурата и наличие на светлина, влиянието на GA₃ е значимо.
3. Жизнеността на семената е относително висока за изследваните произходи (74,35 - 87,80%). Установено е съответствие между жизнеността на семената и кълняемостта им *in vitro*.
4. Кореновите експланти са най-подходящи за индуциране на калусна култура от *G. flavum*.
5. Установено е, че соматичната ембриогенеза е най-подходяща за микроразмножаване на *G. flavum*. Най-голям брой соматични ембриони се образуват на хранителна среда MS с добавени 1 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L TDZ и 0,2 mg/L BAP.
6. Установена е различна честота на образуване на соматични ембриони от ембриогенен калус от два изследвани произхода – Шкорпиловци и Варвара, съответно 43,3% и 11,6%.
7. Най-подходяща за *in vitro* култивиране на *G. flavum* е модифицирана хранителна среда B5 с удвоено количество макросоли, въглероден източник захар в концентрация 20 g/L и добавен 0,5 g/L активен въглен.
8. Развитието на растенията не се различава съществено при култивиране на среди със захар, глюкоза и фруктоза. Включването на манитол и сорбитол като въглеродни източници влияе пагубно на растенията.
9. Директната органогенеза е неподходящ метод за микроразмножаване на *G. flavum* поради затрудненото пъпкообразуване и вкореняване и неблагоприятното въздействие на растежните регулатори върху развитието на растенията.
10. Установена е затруднена *ex vitro* адаптация и аклиматизация при *G. flavum*. Трудност при *ex vitro* адаптацията на получени чрез соматична

ембриогенеза *in vitro* растения е преплитането на корените и тяхното срастване.

11. В по-голямата част от естествените находища на вида, глауцинът е основен алкалоид (съдържание от 0,82 до 2,25%).
12. Установените по-ниски процентни стойности на глауцин в *ex vitro* растенията, в сравнение с растенията, развивали се в естествените находища, е поради намаленото количество на биосинтезираните алкалоиди.
13. Растенията от изследваните естествени находища са част от три новоустановени хемотипове на *G. flavum*, а именно хемотип с преобладаване на глауцин и съдържание на апорфинови и протопинови алкалоиди (Варвара, София); хемотип с преобладаване на глауцин и съдържание на морфинановия алкалоид салутаридин (Дуранкулак); хемотип с преобладаващ алкалоид изокоридин (Шкорпиловци).
14. Поради наблюдаваната нестабилност на състоянието на някои находища, малкия брой индивиди, малката площ и засиления антропогенен натиск, предлагаме мониторинг на находищата с цел повишаване степента на защита.
15. Находището край Поморие е най-подходящ източник за въвеждане на материал в *in vitro* култура поради сравнително високите процентни стойности на глауцин, високите проценти на покълване на семената и стабилното състояние на находището.

7. Приноси

1. За първи път е индуцирана соматична ембриогенеза при *Glaucium flavum* и род *Glaucium*. Разработен е протокол за регенерация на вида чрез соматична ембриогенеза.
2. За първи път са *ex vitro* адаптирани растения, регенерирани *in vitro*.
3. *Glaucium flavum* е изследван в *in vitro* стъблена култура. Изследвано е въздействието на различни хранителни среди, растежни регулатори и условия на култивиране
4. Определени са оптималните условия за покълване на семената при *in vitro* условия за *G. flavum*. Изследвано е влиянието на различни фактори върху кълняемостта – температура, светлина, химически стимулатори, срок и условия на съхранение.
5. За първи път са проследени колебанията в съдържанието на глауцин в растения от девет естествени находища за период от две или три години. Сравнено е процентното съдържание на глауцин в растения от естествени находища, от *ex vitro* адаптирани растения и референтна проба от стопански насаждения. Определени са находищата, в които съдържанието на глауцин е най-високо.
6. Установени са три хемотипа на *G. flavum* за България.

Посочените приноси са оригинални и имат както научен, така и научно-приложен характер. Резултатите от фитохимичния скрининг на *G. flavum* биха били полезни при бъдещо въвеждане на вида в селскостопанска култура за добиване на глауцин, посочвайки най-подходящите находища като източник на изходен растителен материал. Методът на соматичната ембриогенеза може да бъде разработен за мащабно производство на растения в биореактори. Установените три хемотипа по отношение на алкалоидното съдържание на *G. flavum* по българското Черноморие допринасят за обогатяване на данните за вътревидовото му разнообразие в страната.

Публикации по темата на дисертационния труд

Doycheva I., Yankova-Tsvetkova E., Stanilova M. **2017**. Somatic embryogenesis induction in *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae). *Comptes Rendus De'L Academie Bulgare Des Sciences* **70**, 525-530. **IF** 0.233

Doycheva I., Philipov S., Stanilova M. **2017**. Evaluation of glaucine content in Bulgarian Black Sea Coast localities of *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae)", *Natural Product Communications* **12**, 157-158. **IF** 0.884

Doycheva I., Philipov S., Stanilova M. **2014**. Determination of the alkaloid glaucine in four Bulgarian populations of *Glaucium flavum* (Papaveraceae), *Proceedings of Seminar of Ecology - 2014*, 17-21.

Участия в научни форуми с резултати по темата на дисертационния труд

1. First European Symposium. Research, conservation and management of biodiversity in the European Seashores – 8-12 May 2017, Primorsko, Bulgaria.

Участие с постер

Doycheva I., Yankova-Tsvetkova Y., Molle E., Stanilova M., Reproductive capacity and *in vitro* seed germination of *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae)

2. 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Europeann Countries – 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria.

Участие с постер

Doycheva I., Philipov S., Stanilova M., Evaluation of glaucine content in Bulgarian Black Sea coast localities of *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae).

3. Семинар по Екология – 2014, с международно участие. 24-25 април 2014г., София.

Участие с постер

Doycheva I., Philipov S., Stanilova M., Determination of the alkaloid glaucine in four Bulgarian populations of *Glaucium flavum* (Papaveraceae).

Biotechnological approach for multiplication of *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae)

Iva Doycheva

PhD thesis, Sofia, 2017

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research,
Bulgarian Academy of Sciences
e-mail: idoycheva@gmail.com

Scientific advisers: Assoc. Prof. Marina Stanilova, PhD
 Assoc. Prof. Stefan Philipov, PhD

Summary

Glaucium flavum Crantz. (yellow horned poppy) is a medicinal plant species used in the pharmaceutical industry as a source of the alkaloid glaucine, valuable for its antitussive and bronchodilator activity. In Bulgaria the yellow horned poppy is mainly distributed along the Black Sea coast.

The objective of the present PhD thesis was to study the particular requirements of *G. flavum* under the conditions of *in vitro* cultivation and *ex vitro* adaptation, and to compare the localities of the species according to their glaucine content, in order to choose the most appropriate ones as source for further *in vitro* multiplication.

Seeds and aboveground part of flowering plants, were collected from ten Bulgarian localities of the species. Seed germination was found to depend on the abiotic factors temperature and light regime, and the conditions of 15°C in the dark were proved to be optimal. Germination rate varied between localities as well.

G. flavum was recalcitrant for *in vitro* cultivation because of exudates leaching in the medium which resulted in soft and brown shoots. The addition of activated charcoal led to reduction of polyphenol leaching. Medium B5 with doubled macrosalts, 20 g/L of sugar and 0,5 mg/L of activated charcoal was the most suitable for *in vitro* plants growth.

Callus induction was scarce and slow growing. It was found to depend on the type of the explant and the medium composition. Seedling roots were the most appropriate explants, regarding callus induction and growth rate in *G. flavum*.

Indirect somatic embryogenesis was achieved for the first time in genus *Glaucium*, starting from the roots of *in vitro* obtained seedlings. All

stages of somatic embryogenesis were observed in MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L TDZ and 0,2 mg/L BAP. The percentage of embryogenic calli varied between the localities (43,3±0,1% for Shkorpilovtsi and 11,6±0,1% for Varvara). A limited number of plants regenerated by somatic embryogenesis were *ex vitro* adapted due to the accrete roots of some plants. *In vitro* germinated plants survived two years after their acclimatization outdoor, flowered, and formed fruits.

The content of the alkaloid glaucine was evaluated in *G. flavum* plants from nine localities along the Bulgarian Black sea coast during two or three consecutive years, in order to select those with highest glaucine content. Some fluctuations of glaucine content were observed during the years. Pomorie and Ahtopol maintained high percentages of glaucine in the dry plant material, being 2,3%±0,1 for Pomorie in 2014 and for Ahtopol in 2015. The lowest percentages of glaucine were recorded in the plant material from Shkorpilovtsi.

Glaucine percentages in *ex vitro* plants were lower than those occurring in natural conditions due to the generally reduced amount of the biosynthetic alkaloids in the plant material.

Three alkaloid chemotypes of *G. flavum* in Bulgaria were suggested. The first one contains aporphines and protopines with a main alkaloid glaucine (Varvara and Sofia localities). The second chemotype contains also aporphine and protopine alkaloids, but the main alkaloid is isocorydine (Shkorpilovtsi), and the third chemotype contains, besides these two types of alkaloids and the morphinane alkaloid salutaridine (Durankulak).

The locality of Pomorie stood out because of both high content of glaucine and high seed germination rate, therefore it was chosen as the most appropriate source of plant material for further *in vitro* multiplication of the species.