

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

НА ДОЦ. Д-Р МАРИНА ИВАНОВА СТАНИЛОВА

**Секция „Приложна ботаника“ при Отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ на Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания,
Българска академия на науките**

Във връзка с конкурса за заемане на академичната длъжност “професор” в Професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Ботаника“, за нуждите на ИГ „Растителни биотехнологии и *ex situ* опазване на редки, лечебни и ароматни растения“, секция „Приложна ботаника“, обявен в Държавен вестник, бр. 14 от 18.02.2022 г., стр. 101.

Цялостната ми научна дейност, от темата на докторантурата ми до настоящите ми разработки, е в областта на растителните биотехнологии. Разбира се, това е много широка област и следва да уточня, че всичките ми изследвания са ориентирани в две стратегически насоки, свързани помежду си: опазване на биоразнообразието и въвеждане на ценни видове в агрокултура. По-конкретно това обхваща прилагане на различни *in vitro* методи за ускорено микроразмножаване с цел *ex situ* и *in situ* опазване на редки и застрашени растителни видове, с акцент върху ценни лечебни и ароматни растения с ресурсен дефицит и потенциал за култивиране. В по-голямата си част обектите на изследване са видове от българската флора, често ендемични за България или за Балканския полуостров, а поставените цели имат отношение както към изясняване на чисто научни въпроси, така и към възможността за прилагане на получените резултати в практиката. Отправна точка при избор на видовете са някои нормативни документи, като Закона за биологичното разнообразие (2002), Закона за лечебните растения (2000), Закона за защитените територии (1998), Червената книга на Р. България (1984, 2015), както и насочваща информация, получена от български производители. В зависимост от обектите на изследване, целите в дългосрочен план са различни: стабилизиране на естествените популации на растителни видове с консервационен статут или създаване на пилотни насаждения от лечебни и ароматни растения. За постигането им са поставени множество конкретни цели: създаване на протоколи за размножаване на отделните видове, сравнително изследване на характеристиките на изходните растения, *in vitro* културите и адаптираните и аклиматизирани растения на открито; селекция на индивиди с желани качества и създаване на *in vitro* клонове от тях; стимулиране на биосинтеза на биологично-активни вещества. При насоченост на изследванията към създаване на агрокултура е важно да се приложи клонално размножаване за запазване на селектираните генотипи, докато за стабилизиране на естествените популации е подходящо да се въведат колкото се може повече генотипи, които да осигурят генетичното им разнообразие и пластичност. Успехът на размножаването зависи от правилния избор на растителни експлантите, генотипа, състава на хранителната среда и условията на култивиране. Различните видове често имат специфични изисквания към състава на хранителната среда и условията на

култивиране. Тези изисквания се наблюдават особено често по отношение на концентрациите и комбинациите от растежни регулатори, добавяни в средата, поради което оптималният ѝ състав се определя емпирично за всеки вид. От съществено значение е проследяването на спектъра и съдържанието на биологично активните вещества в *in vitro* културите и *in vitro* размножените и адаптирани към външната среда растения, както и контролът на генетичната стабилност на получените растения. *Ex situ* колекцията на открито и оранжерията са от важно значение за опазване на ценния генофонд на редки, ендемични и лечебни растения.

По стечение на обстоятелствата, в началото на кариерата ми, непосредствено след обучението ми в Института по генетика и защитата на дисертацията ми, начинът на финансиране на научните изследвания се промени (от целево към проектно), което доведе до необходимостта аз да създам материалната база за развитие на растителните биотехнологии в Института по ботаника. Това стана възможно благодарение на опита през 3-месечната ми специализация през 1996 г. в Университета в Реймс, Франция, финансирана от ЮНЕСКО, новите възможности за разработване на големи проекти по програмата на НАТО „Наука за мир“ и работата ми в екип с няколко колеги от Института по ботаника, както и с подкрепата на колегите от Реймс, съгласили се на партньорство с нас, подкрепата на още един научен партньор от Пловдив, и на увенчалите се с успех усилия да привлечем индустриален партньор въпреки периода на приватизация и инфлация, за да постигнем изискванията на финансиращата програма. И така, първият ми проект беше международен, 5-годишен (SfP-974453 – Bioproduction, 2001-2006), а позицията ми в него бе „научен ръководител“. **Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения**, състояща се от няколко сектора (помещения за *in vitro* размножаване и фитостатна, микроскопска и хроматографски анализ) с апаратура на стойност около 100 000 евро, отговаряща в голяма степен на изискванията за добра лабораторна практика, бе създадена и тържествено открита през 2002 г. В рамките на този проект придобих опит да планирам и организирам научни експерименти, да ръководя дипломанти, да координирам партньори и да поемам всякакъв вид отговорност, включително финансова. През 2011 Биотехнологичната лаборатория бе допълнена с фитотрон за *ex vitro* адаптация на *in vitro* получените растения, който в периода 2015-2017 бе разширен със сектор за хидропонни и аерохидропонни системи, позволяващи изпитването на алтернативни биотехнологични методи за покълване на семена и вегетативно размножаване на растения от целевите групи видове. В тази връзка е и приносът ми към Института по ботаника, съответно към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, за полагане на началото и за развитието на научното **направление по растителни биотехнологии**, обвързани с тематиката и мисията на института.

Основните ми **научни приноси** през изминалите 20 години от създаването на Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения (от които 12 след хабилитацията ми) са в няколко области: *In vitro* микроразмножаване на застрашени и защитени видове лечебни растения от българската флора; Клонално *in vitro* намножаване на

високопродуктивни лечебни и ароматни растения; *In vitro* покълване на семена и регенерация на растения от растителни видове с проблемно размножаване и консервационно значение; *Ex vitro* адаптация на растения във фитотрон и последваща аклиматизация към условия на открито в *ex situ* колекциите или към природните условия на естествените популации, от които произхождат; *In vitro* биосинтеза на алкалоиди от лечебни растения; Анализ на биосинтеза на различни биологично активни вещества при *in vitro* размножени растения; Селекция на високопродуктивни *in vitro* клонове за понататъшно въвеждане в земеделска култура; Хидропонно и аерохидропонно размножаване на растения от семена или вегетативни органи.

Характерна особеност за научните ми изследвания е цялостното разглеждане на поставените проблеми в **дългосрочен план** и довеждането на резултатите до завършен край, при което се създава възможност за прилагане на новополучените знания в **практиката**. В тази връзка, тематичното разделяне на научните ми приноси на такива преди и след хабилитацията би било условно. Разликата е по-скоро в много по-големия брой видове, с които съм работила в периода след хабилитацията, благодарение на множеството разработвани проекти. Акцентът определено е поставен върху разработките след хабилитацията, като при илюстриране на приносите в скоби са посочени номерата на публикациите, които ги отразяват, съответстващи на списъците, като номерата в **bold** се отнасят за публикации след хабилитацията. С цел избягване на повторение във формулировката на приносите, те са обединени за Показателите В и Г от таблицата на справка за критериите. Публикациите, които са избрани да представят работата ми като **хабилитационен труд** във връзка с кандидатурата ми за професор по ботаника, са свързани с разработки, в които имам водеща роля в авторския колектив (публикациите с номера **3, 4, 5, 6, 15, 17, 18** и **23**). Повечето от другите публикации са свързани с разработки по темите на докторантите ми и на млади учени, с които работя и напътствам, или акцентът е върху фитохимични анализи, ембриологични, генетични и др. проучвания, в които съавторите ми имат повече заслуги. Монографията отразява значими мои приноси, но според изискванията в справка за хабилитационен труд могат да участват само публикации в издания с квартали. Цитиранията на избраните статии показват, че изнесените в тях резултати са намерили отзвук в международната научна общност. Някои резултати от дългогодишни проучвания все още не са публикувани, от една страна поради естеството на експериментите, изискващи години за доказване на стабилни резултати, а от друга страна поради липса на технологично време, при което само частично са представяни на научни форуми. Такъв е случаят например с мехуресточашковото сграбиче (*Astragalus physocalyx*), критично застрашен вид според критериите на IUCN, работата с който започна през 2010 г. по проект на ПУДООС във връзка с Плана за действие за опазването му. Успешното размножаване в условия *in vitro* още не е гаранция за крайния успех. От стотиците получени растения след преодоляване на проблемите с кълняемостта на семената и допълнителното размножаване чрез директна органогенеза, оцеляха много малко вследствие на активирането на ендофитни микроорганизми по време

на поредното субкултивиране, което е стрес за растенията. Повторихме и потретихме опитите и след края на проекта, докато стигнахме до успешно вкореняване и *ex vitro* адаптиране на този много бавно растящ вид. Върнатите на два пъти в естествената популация растения не оцеляха поради сухия климат и невъзможността за допълнителни грижи, но част от растенията, засадени на Младежкия хълм в Пловдив, вече се аклиматизираха и стигнаха до цъфтеж. Предвидено е още едно засаждане на последната партида *in vitro* размножени растения от този вид, които вече 3 години чакаме да пораснат достатъчно в оранжерията, за да имат шанс да оцелеят в природата. Често застрашените видове са бавнорастящи и работата с тях изисква време, надхвърлящо срока на проектите, по които се разработват задачите по опазването им. Затова и резултатите, свързани с тях, носят по-голямо удовлетворение, особено след успешното им прилагане в практиката.

Научни и научно-приложни приноси:

1. *In vitro* микроразмножаване на застрашени и защитени видове лечебни растения, предимно от българската флора.

Лечебни видове растения, които са успешно *in vitro* размножени в Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения на ИБЕИ и аклиматизирани към условията на опитните площи на открито, от мен или под мое ръководство респ. с мое участие, са: блатно кокиче (*Leucosium aestivum*) (1, 4, 12, 16, 17, 18, 19), (*Pancretium maritimum*) (14, 20), (*Ruscus aculeatus*) (15), (*Glaucium flavum*) (8, 22), лечебна делянка (*Valeriana officinalis*) (28, 39), 4 вида шапиче (критично застрашения за България *Alchemilla mollis* и българските ендемити *A. achtarowii*, *A. jumrukchatica* и *A. bundericensis*) (2, 3, 4, 34), (*Arnica montana*) (18, 26) гол сладник (*Glycyrrhiza glabra*) (30), *Narcissus palidullus* и *Narcissus* cv. Hawera (19), пиретрум (*Tanacetum cinerariifolium*) (14, 24), жълт смил (*Helichrysum italicum* и *H. arenarium* – в процес на публикуване на резултатите), лечебна иглика (*Primula veris* – в процес на публикуване). За много от тях са създадени **специфични протоколи** за ефективно *in vitro* размножаване, готови за приложение в практиката при необходимост от бързо получаване на големи количества посадъчен материал за агрокултури. В процеса на търсене на оптималните хранителни среди и условия за култивиране са установени някои характерни особености на *in vitro* културите, свързани с биологията на съответния вид, които обичайно остават неизследвани от биотехнолозите при краткотрайни експерименти.

1.1. Влияние на състава на хранителните среди върху растежа и биосинтеза на вторични метаболити при лечебни растения:

- Основните биологично-активни вещества (БАВ) в меколистното шапиче (*Alchemilla mollis*) са флавоноиди и танини, като съдържанието на фенолни съединения в този вид е най-високо измежду другите видове на рода в България, наред с ендемита *A. jumrukchatica*, но надземната му маса, която се използва, е най-висока. *A. mollis* е критично застрашен в България според критериите на IUCN, с единствена популация в НП Централен Балкан, включен е в Червената книга на РБългария и защитен от Закона за биологичното разнообразие. Шапичето е ценно поради антиоксидантната активност на

надземната маса, използва се като лечебно растение при различни гинекологични, бъбречни и други заболявания. Сравнени са ефективността на размножаване и съдържанието на БАВ в култури, отглеждани на хранителни среди, различаващи се по концентрациите на растежните регулатори и на основните макроеlementи в средата. Установени са статистически достоверни разлики, показващи най-висока размножителна способност при високи концентрации на бензиламинопурин (БАП) и алфа-нафтилоцетна киселина (НОК) в началните месеци на *in vitro* култивирането, докато съдържанието на флавоноиди и танини е най-високо на контролната среда без регулатори и при аклиматизираните на открито растения, независимо от средата, на която са били размножени (3). Приносите от това изследване са както **научни**, така и **приложни**, позволяващи бързо *in vitro* размножаване на богати на растежни регулатори среди, последвано от вкореняване на среда без регулатори и получаване на насаждение на открито с високо съдържание на БАВ.

- Сравнена е размножителната ефективност на клонални култури от *Arnica montana* в зависимост от състава на хранителните среди. На базата на 12 варианта растежни регулатори е създаден **протокол** при избор на среда, съдържаща БАП и индолилоцетна киселина (ИОК), стимулираща морфогенетичния потенциал, при което 95% от експлантите се развиват (18). Отбелязано е повишаване на ефективността на размножаване с нарастване броя на субкултивиранията, като за няколко месеца от един експлант са получени над 12 нови растения. В допълнение е постигнато 100% *in vitro* вкореняване на растенията на среда с намалена наполовина концентрация на основните соли и добавена индолилмаслена киселина (ИМК).

- При блатното кокиче също е отбелязано влияние на състава на хранителните среди върху размножителната способност и биосинтеза на алкалоиди, но там тази зависимост е много по-сложна поради сезонния характер на биосинтеза, който се запазва под формата на динамика в биосинтеза, въпреки че регулацията на пиковете във времето е нарушена. По-подробно това е представено в т. 3.2. от приносите.

1.2. Влияние на култивационните съдове и типа на хранителните среди върху растежа и биосинтеза на вторични метаболити при лечебни растения

- Създаден е **ефективен протокол** за *in vitro* размножаване на меколистно шапиче (*Alchemilla mollis*), на базата на сравнително изпитване на разнообразни *in vitro* методи при една и съща хранителна среда, съдържаща БАП и НОК (4). Паралелно е изследвана размножителната способност на култури в твърда агарова среда, течна статична, както и имерсионна култура за временно потапяне (TIS в контейнери RITA[®]), при дългосрочно култивиране и многократно субкултивиране. Оценена е приложимостта на всеки метод като е взета предвид биологията на вида и са обобщени количествените и качествените параметри. Установено е, че най-ефективно е дългосрочното размножаване върху втвърдена с агар среда, при нарушаване на апикалната доминантност на *in vitro* растенията (размножителният коефициент се увеличава с всяко субкултивиране и достига до 850

растения от едно изходно семе за 13 месеца), докато TIS-културите са благоприятни главно за получаване на растения с високо качество, образуващи коренища с нови растения, както и коренчета с власинки, улесняващи последващата *ex vitro* адаптация. Развитието на коренищата зависи от култивационните съдове: пренесени върху агарова среда, те образуват нови стъбла, но не се вкореняват, а отделените стъбла се вкореняват лесно. Течните статични култури стимулират бързото образуване на многобройни стъбла (средно 32 за 3 месеца), но не са подходящи, тъй като водят до намалена здравина на стъблата и необратимо влошаване качеството на част от растенията поради витрификация.

- Създаден е **ефективен протокол** за *in vitro* размножаване на *Arnica montana*, при използване на среда, съдържаща БАП и ИОК и паралелно изпитване на агар-втвърдени среди, течни статични и имерсионни култури за временно потапяне (TIS в контейнери RITA[®]) (26). Най-висока размножителна способност е отбелязана в TIS-системата, при която се запазват преимуществата на течната среда като същевременно се избягват недостатъците ѝ: средно 18.2 нови растения от един експлант за 5 седмици. В допълнение, същият тип култури синтезират и най-високо съдържание на сескитерпенови лактони с противовъзпалителни, антиоксидантни и др. свойства, ценни за фармацевтиката и козметиката. Изследването показва нови научни данни за арниката, като протоколът има и практическо значение при създаване на насаждение от този ендемичен за Европа лечебен вид, застрашен поради загуба на местообитания и свръхексплоатация на популациите.

- С цел определяне на оптималния добив на алкалоиди са изследвани растежът на различните вегетативни органи (луковици и листа) при блатно кокиче (*Leucojum aestivum*) и пясъчна лилия (*Pancratium maritimum*) и локализацията на натрупване на алкалоидите в тях (1, 20). Установено е, че течните среди и нормалната концентрация на захар стимулира растежа на листата, а агаровите среди и удвоената концентрация на захар води до уголемяване на луковичките и повишаване на процента на сухата маса в културата (рандемана). Въпреки по-високото съдържание на галантамин в листата на блатното кокиче, по-висок е добивът на *in vitro* култура с по-големи и плътни луковички (1).

1.3. Клонално *in vitro* размножаване на високопродуктивни лечебни и ароматни растения. Влияние на генотипа и на типа на първичните експланти:

При *in vitro* размножаване на лечебни растения с цел подготвяне на култивирането им в агрокултура, е важно да се направи предварителен скрининг на популационно и/или индивидуално ниво за състава и съдържанието на ценните БАВ, синтезирани от вида. Като втора стъпка се добавя и селекция на *in vitro* клонове с висока размножителна способност, тъй като създаването на бъдещото насаждение зависи от възможността да се произведе бързо разсад. Селекцията включва също и наблюдение и избор на индивиди, образуващи по-голяма биомаса, която също е фактор за високата продуктивност на насаждението.

- Установено е определящото значение на генотипа на блатното кокиче (*Leucojum aestivum*) както за размножителната способност, така и за съдържанието на алкалоиди, в

частност галантамин и ликорин, които са от най-голямо практическо значение. Изследванията са направени в дългосрочни култури, включващи над 20 *in vitro* клона (1,16). Паралелни и последващи хроматографски анализи показаха запазване на алкалоидния профил и алкалоидното съдържание в отделните клонове в *ex situ* колекцията на ИБЕИ (съставена от индивиди от 26 български популации), в продължение на 10 години, независимо от еднаквите почвени и климатични условия в колекцията. Тези резултати са приоритетни и от голямо значение както при евентуално създаване на насаждение, така и при избор на изходен растителен материал за биосинтез на алкалоиди в биореактори. Нашите резултати, обхващащи дългогодишни изследвания, коригираха предходните схващания за вида и доказаха определящото значение на генотипа.

- Освен генотипа, при блатното кокиче (*Leucojum aestivum*) е установено и същественото значение на типа на първичния експлант, както и на ориентацията му към хранителната среда, от които зависи успешното *in vitro* клонално размножаване (4, 1). Обичайно вегетативното размножаване на луковичните видове е от експлант, изрязани от луковицата, което често е свързано с трудности при първоначалното въвеждане на чиста култура, поради силното микробиално присъствие в подземните органи, а от друга страна използването на луковицата води до унищожаване на изходното растение. Принос при клоналното размножаване на блатно кокиче е успехът ми при въвеждане в култура на сегменти от листа. При това е установено също, че ориентацията на експланта към средата е от съществено значение и въпреки че морфогенезата винаги е върху долния срез на листа, когато той е потопен в средата, води до калусообразуване и евентуално до индиректна органогенеза, докато при противоположна ориентация на експланта се наблюдава директна органогенеза и образуване на луковички и цели растения, при което се избягва опасността от соматклонално вариране.

- Проучването на морфогенетичния потенциал на лечебната диланка (*Valeriana officinalis*) показаха, че най-подходящи за клонално *in vitro* размножаване на този вид са сегменти от цветоносните дръжки, като първични експлант, както и сегменти от *in vitro* корени от коренова култура, като вторични експлант с висок потенциал за размножаване. Това е удобно предвид краткия срок на наличност на цветни дръжки (39, дипломна работа на Ася Кожухарова, 28). Установяването на подходящите вегетативни органи за клонално размножаване е оригинален принос от съществено значение, тъй като запазва генотипа на индивида, произхождащ от високопродуктивен на БАВ сорт, което не може да се постигне при използване на семена като изходен материал.

- В някои случаи различията в съдържанието на биологично-активни вещества са на популационно ниво, напр. при голия сладник (*Glycyrrhiza glabra*), който образува подземни стълони, от които всяка пролет израстват нови стъбла, като с годините стълоните свързват в мрежа индивидите. Предварителното изследване на съдържанието на глициризин и флавоноиди в естествените популации на голия сладник доведе до избор на най-подходящ изходен растителен материал за въвеждане в *in vitro* култура (20). При

семенно размножаващи се лечебни растения също са отбелязани различия в съдържанието на БАВ и дори различни хемораси, напр. при жълтия мак (*Glaucium flavum*), поради което предварителният скрининг на алкалоидите е от важно значение за получаването на високопродуктивни растения чрез биотехнологични методи (7, 10).

- Направена е *in vitro* селекция и на клонове от пиретрум (*Tanacetum cinerariifolium*), произхождащи от отделни семена, като всеки клон е получен чрез неколккратно субкултивиране при директна органогенеза. Клоновете показват различна ефективност на размножаване. Растения от 4 селектирани клона са успешно аклиматизирани в колекцията на ИБЕИ в оранжерията и на открито и показват различни стойности както на броя на цветните кошнички, така и на основните пиретрини в тях. Като се има предвид, че пиретрините се съдържат основно в цветните кошнички и имат различна инсектицидна активност, ясно е, че е важно бъдещото насаждение да бъде от високопродуктивни клонове (резултатите са в процес на публикуване).

2. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация на открито

Адаптацията на *in vitro* размножените растения към природните условия е ключов процес за цялостния успех на ускореното размножаване, независимо от конкретните използвани методи. При много видове този етап е труден и наричан ‘bottleneck’, а видовете са известни като непокорни ‘recalcitrant species’, като често се публикуват резултати, които остават само на етап лабораторни изследвания. За успешното справяне с проблемите на аклиматизацията е важно да се познават биологията, анатомията и морфологията на растителните видове.

2.1. *Ex vitro* адаптация във фитотрон и създаване на *ex situ* колекции на открито.

- За първи път е постигната *ex vitro* адаптация на *in vitro* размножени растения от 4 лечебни вида шапиче: критично застрашения в България вид *Alchemilla mollis* (меколистно шапиче) и българските ендемити от същия род: *A. jumrukczalica*, *A. achtarowii* и *A. bundericensis*. Адаптацията е успешна както за индивидуално вкоренени *in vitro* растения, така и при пренасяне на цели *in vitro* получени клъстери от стъбла с общи корени. Експериментът е мащабен, с над 2600 *in vitro* растения (34). Това са и първите опити за адаптация с използване на специален климатичен шкаф през първия месец след края на размножаването *in vitro*. Стриктният контрол на условията позволява постепенно приспособяване към по-ниска относителна влажност на въздуха, което е критичен процес за много видове растения поради известни временни структурни промени в анатомията на петурата. Благодарение на специалните условия във фитотрона процентът на оцелелите растения бе повишен от 20% на 85%, а след експериментално определяне на най-подходящите температура, осветление и въздушна влажност в климатичния шкаф, процентът на оцелелите растения е повишен до 98%. Загубите в следващите етапи на аклиматизация в оранжерията и презимуване на открито са незначителни, съответно 5% и 0.6%, което доказва решаващото значение на първия месец на адаптацията, при стриктно

задаване на параметрите на осветление, температура и въздушна влажност. Резултатите са както от **научно**, така и от **приложно** значение, за въвеждане на шапичето в агрокултура.

- Важно е да се отбележи, че често съдържанието на биологично-активните вещества в *in vitro* културите спадат значително при отглеждане на хранителни среди, стимулиращи размножителната ефективност. Това обаче обикновено не е проблем, тъй като при прехвърляне на получените *in vitro* растения в основна среда без растежни регулатори и особено при адаптацията и аклиматизацията им на открито, съдържанието на БАВ се увеличава много бързо и достига нивата, характерни за изходните растения, взети от популациите. Много ясни в това отношение са резултатите, получени при култивиране на меколистното шапиче (*Alchemilla mollis*), при което съдържанието на флавоноиди и танини е най-високо в аклиматизираните растения в колекцията на Витоша (3), както и резултатите при култивиране на Давидовата метличина (*Centaurea davidovii*), при която съдържанието на феноли и флавоноиди бързо се възстановява през първата година на аклиматизацията в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, а през втората година, по време на масовия цъфтеж, съдържанието на тези БАВ е значително по-високо от това в диворастящите растения от този вид (6). В допълнение, в *in vitro* културите от *C. davidovii* е отбелязано запазване на съдържанието на един сескитерпенов лактон и многократното му увеличаване в аклиматизираните растения в *ex situ* колекцията (6).

- В много случаи *in vitro* получените растения, успешно включени в колекциите на ИБЕИ на открито, остават извън публикациите, понеже този процес изисква доста време, а финансиращите организации изискват публикуване на резултатите по разработваните проекти в срока на проектите. По-долу са посочени примери на успешно адаптирани и аклиматизирани видове както в колекциите, така и в някои естествени популации.

2.2. Подсилване на естествените популации на видове с консервационно значение с *in vitro* размножени растения.

При размножаване на застрашени видове растения с цел връщането им в природата за подсилване на естествените им популации е важно да се следи стриктно произходът на растенията и връщането да се извършва в същите популации, от които те произхождат, за да се опази генетичното разнообразие на вида. Със същата цел следва да се избягва клоналното размножаване, освен в случаите на невъзможност семената да покълнат или на изключително малък брой налични изходни семена.

- Сред ендемичните и застрашени видове растения, размножени *in vitro* и засадени с помощта на доброволци в естествените им находища за подсилване на популациите им, са: Цар-Борисовият лопен (*Verbascum tzar-borisii*), анасоновият лопен (*Verbascum anisophyllum*), Давидовата метличина (*Centaurea davidovii*), тракийската метличина (*Centaurea pseudaxillaris*), мехуресточашковото сграбиче (*Astragalus physocalyx*), тракийски клин (*Astracantha thracica*) (обобщени данни в 12). При последващ мониторинг на засадените десетки растения от тези видове е установено, че много от тях са се

аклиматизирали успешно и са стигнали до цъфтеж. Отбелязани са и интересни особености, свързани с приспособяването към естествената популация, като например по-ранно изцъфтяване на засадените растения от *Centaurea pseudaxillaris* (27), различна фаза на развитие на засадените растения от *Verbascum tzar-borisii*, получени чрез лабораторно покълване на семената *in vitro* и *in vivo* (непубликувани данни, представени само на конференция). Тези различия вероятно са временни, което може да бъде проверено при нов мониторинг, благодарение на ясното маркиране на засадените от нас растения.

- При други редки видове от родовете *Centaurea* (33), *Lilium* (3), *Verbascum* (*V. davidoffii* – 31; *V. anisophyllum* – 38), *Vanda* (в процес на публикуване), както и някои псамофити от българското Черноморие (13) и видове от алпийската зона на планините като напр. глациалния реликт *Papaver degenii* (25) резултатите са успешни само на лабораторно ниво или са достигнали до аклиматизация в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, напр. *Lilium rhodopaeum* (23), *Dianthus* (36), *Glycyrriza glabra* (в процес на публикуване). Много интересни резултати получихме при *in vitro* култивирането на *Papaver degenii* в имерсионни TIS-култури, при които наблюдавахме лимит в дължината на стъблото и постоянно образуване на нови стъбла при отмиране на старите. На базата на аналогията на развитие в естествени и в *in vitro* условия при други видове, направихме предположения за развитието на вида в естествени условия през зимния сезон под снега на алпийската зона, където биологията му е невъзможно да бъде проследена (25).

- В някои случаи покълването на семената се оказва невъзможно или е свързано с аномалии, както е при родопския крем. *Lilium rhodopaeum* (23). В такива случаи се прибегва към вегетативно размножаване, въпреки че от съображения за опазване на растенията, се използва малък брой изходни индивиди, при което получените *in vitro* растения често са генетично идентични. Такъв е случаят с *L. rhodopaeum*, размножен от луковични люспи, след постигане на успешна стерилизация на люспите (2, 23).

- В други случаи броят на наличните семена е изключително малък, както при *Centaurea davidovii*, където от само 9 семена, неизядени от насекоми, покълна само едно и всички *in vitro* размножени растения представляват клон, получен чрез многократно субкултивиране на единствения поник, като размножителната способност на среда с БАП бе висока и за няколко месеца бяха получени стотици нови растения, 96% от които бяха успешно аклиматизирани, а изнесените 44 в *ex situ* колекцията на ИБЕИ достигнаха цъфтеж на втората година (5). Наблюдавана бе както директна, така и индиректна органогенеза, през калус, поради което бе важно да се провери генетичната стабилност на клона. ISSR анализът показва, че всички растения в колекцията са генетично идентични (32). От една страна, това е неблагоприятно за генетичния баланс в популацията, поради което в нея бяха върнати само 3 индивида; от друга страна, получените растения са подходящи за *ex situ* опазване на вида в ботаническите градини, поради което предоставихме по няколко индивида на градините на БАН и на СУ във Варна.

- Извън публикационно отразените резултати, поддържахме тесни връзки с някои ботаническата градина на БАН и ботаническата градина на СУ „Св. Климент Охридски“ край Варна, на които сме предоставили по няколко индивида от редки и застрашени видове, размножени от нас с *in vitro* методи: Цар-Борисовия лопен (*Verbascum tzar-borisii*), анасоновия лопен (*Verbascum anisophyllum*), Давидовата метличина (*Centaurea davidovii*). Тази практика е важна и намерението ни е да я продължим и с други видове.

2.3. Стъпки към въвеждане на *in vitro* размножени лечебни и ароматни растения в агрокултура.

- Успешно е завършена аклиматизация на *in vitro* размножените растения от изследваните видове шапиче (*Alchemilla mollis*, *A. jumrukczalica*, *A. achtarowii* и *A. bundericensis*) на различна надморска височина: 500 m в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, 1500 m на *ex situ* колекциите ни на Витоша и на Беглика в Родопите (3, 34), както и на 110 m и много по-горещ климат в с. Кърналово, община Петрич. Аклиматизираните растения достигнаха до цъфтеж още на първата година след засаждането им в колекциите и се отличават с високо съдържание на флавоноиди, които са основните им биологично-активни вещества, както и с висока антиоксидантна активност (3). Тези резултати представляват принос с **научно-приложна** стойност, тъй като доказаха възможността лечебните видове шапиче да се култивират при различна надморска височина и температура, при условие, че има достатъчно влага. Като най-перспективен вид е избран *Alchemilla mollis* поради по-голямата биомаса, която натрупва. Над 800 растения от *A. mollis* са предоставени на Биопрограма АД и използвани за създаване на **пилотно насаждение**. Около 20 растения от всеки от четирите вида се поддържат в *ex situ* колекцията на ИБЕИ.

- Успешно са адаптирани във фитотрон около 150 клонално размножени растения от индивид, принадлежащ към високопродуктивен сорт *Valeriana officinalis* (39, дипломна работа на Ася Кожухарова по темата; основните резултати все още не са публикувани). Успехът на адаптацията е висок: 91% в първата стъпка на адаптация в климатичния шкаф и 100% във фитотронното помещение. Растенията са аклиматизирани във фермерско пилотно насаждение, с посредничеството на Биопрограма АД, съгласно договор за сътрудничество. Имаме данни за високо съдържание на БАВ през първите години на насаждението.

3. Биосинтез на алкалоиди от лечебни растения в *in vitro* условия.

3.1. Динамика на биосинтеза на алкалоиди в дългосрочни *in vitro* култури.

- Важен **приоритет** в изследванията ми се явява разкриването на динамиката на биосинтеза на алкалоиди в дългосрочни *in vitro* култури от блатно кокиче (*Leucosjum aestivum*), при култивиране на една и съща хранителна среда без добавени растежни регулатори, при постоянни условия във фитостатната: температура 23±2 °C и осветление 16 часа на денонощие (17, 1). Изследването на биосинтеза в кратък период показва

необяснимо вариране, което може да е както към повишаване, така и към понижаване на съдържанието на алкалоидите. Едва при натрупване на данни за над 20 клона в продължение на 2 – 3 години, се изясни, че динамиката в биосинтеза на галантамин и ликорин се проявява във всички *in vitro* култури и е отражение на динамиката на биосинтеза на тези алкалоиди в естествени условия, но до голяма степен произволна и без връзка със сезоните. В естествени условия блатното кокиче има физиологичен покой през лятото (надземната маса е отряла и само луковицата е жива под земята) и принудителен покой (при настъпване на зимните ниски температури след слабо прорастване на листата през есента). Максимумът на биосинтеза на галантамин е във фаза бутонизация и масов цъфтеж, а след прецъфтяването съдържанието на галантамин рязко спада. В постоянните условия на фитостатната няма стимул за промяна в биосинтеза, но тя се наблюдава периодично, сякаш „биочасовникът“ на вида е повреден и не е ясно какво влияе като отключващ и спиращ механизъм за биосинтезата. На пръв поглед изглежда сякаш профилът на отделните *in vitro* клонове (съответстващи на хеморасите в природата) се променя, но при внимателен анализ на данните става ясно, че той се запазва и само проявлението му зависи от неизвестни засега фактори (1).

- Установена е корелация в динамиката на алкалоидния биосинтез в отделни клонове, различаваща се от корелацията на динамиката на други клонове (1). Нарушената регулация на динамиката на биосинтеза прави непредвидима промяната в съдържанието на алкалоидите в условия *in vitro* при органни култури от блатно кокиче. Същата зависимост не се наблюдава в клетъчни култури, където очевидно регулацията на биосинтеза липсва напълно, понеже се осъществява на по-високо равнище на тъканна организация. Тази е и причината органните култури от директно получени растения от блатно кокиче да не са подходящи за култивиране в биореактор.

- Отрицателната корелация в биосинтеза на основните алкалоиди галантамин и ликорин, наблюдавана при някои *in vitro* клонове от блатно кокиче, поставя под въпрос тезата за защитната роля на алкалоидите в растенията, тъй като логиката би била при стрес да се повишава съдържанието на всички алкалоиди едновременно, докато в действителност максимумът на единия алкалоид съвпада с минимума на другия и обратно, през целия период на култивиране, установено с хроматографски анализи на всеки 3 месеца в продължение на 2 до 3 години за отделните клонове (1).

- Отхвърлено е допускането на други автори, че биосинтезата на галантамин се извършва изключително в цветните органи на блатното кокиче, понеже в *in vitro* органи култури, състоящи се само от вегетативни органи (малки луковички с листа с различна дължина) съдържанието на този алкалоид по време на максимумите в динамиката се запазва почти същото като в листната маса на нормални растения от съответния генотип във фаза цъфтеж (1).

3.2. Стимулиране на биосинтеза на алкалоиди в *in vitro* култури.

- Изследвано е стимулиране на биосинтеза на алкалоиди в *in vitro* култури от блатно кокиче с различни методи: добавяне в хранителната среда на прекурсори на алкалоидите (аминокиселините тирозин и фенилаланин, както и казеинов хидролизат), както и създаване на стрес чрез третиране с елиситори (жасмонат) или с различен вид музика. Независимо от метода на стимулиране, резултатът е с положителен ефект само ако въздействието попадне в низходящата фаза на динамиката (максимумите и минимумите се следят паралелно в култура на контролна среда от съответния клон). Това доказва от една страна определящото влияние на динамиката на биосинтеза спрямо влиянието на стимулаторите, което е второстепенно, а от друга страна показва, че всеки клон има максимален капацитет на биосинтез на алкалоидите, който не може да надвиши (1). Научните ми приноси във връзка със стимулирането на биосинтеза са приоритетни.

- Резултатите, получени при стимулиране на биосинтеза на алкалоиди в *in vitro* култури от блатно кокиче, са аналогични при третиране с веществени стимули (прекурсори, жасмонат) и с музика, което доказва възможността на биосинтеза да се влияе с вълнови методи (1). Изясняването на механизмите на влиянието на различен тип музика, при което се получават различни резултати, се нуждае от допълнителни изследвания от интердисциплинарен характер, в сътрудничество с генетици и квантови физици.

Изясняването на механизмите на стимулиране на биосинтеза са от практически интерес: опитите за мащабиране на *in vitro* производство на алкалоиди от органива култура на вид с присъщ физиологичен покой в естествени условия биха били безполезни преди да се разбере механизма на регулиране на биочасовника на културата и да се спре динамиката на биосинтезата в най-високата ѝ точка.

4. Хидропонно култивиране на растения.

Напоследък прилагането на хидропонното култивиране навлиза при някои лечебни растения със затруднено размножаване. Едно от основните преимущества на хидропониките е свързано с ускорения растеж. В тази връзка е подходящо прилагането му и при бавнорастящи *in vitro* култури след първоначалното ускорено размножаване *in vitro*. През последните години във фитотрона на ИБЕИ бе създаден хидропонен сектор, постепенно оборудван с различни типове хидропонни системи, различаващи се по начина на подаване на хранителния разтвор, и подходящи за култивиране на растения от вегетативни органи (резници, листа) или за покълване на семена. От значение е също и изборът на подходящ субстрат или липса на такъв, в зависимост от изискванията на растителния вид. До момента опити за хидропонно култивиране са направени при видовете градински чай (*Salvia officinalis*) (13), ехинацея (*Echinacea purpurea*) (40), родопски силивряк (*Haberlea rhodopensis*) (15), синя айважива (*Alkanna tinctoria*) (17), родопски крем (*Lilium rhodopaeum*) (23), 3 вида мащерка (*Thymus comptus*, *T. longidentatus*, *T. zugioides*) и жълт смил (*Helichrysum italicum*) (непубликувани данни, изнесени само на конференция), мечо грозде (*Arctostaphylos uva-ursi*) и червена боровинка (*Vaccinium vitis-idaea*) (42).

- Много успешно бе размножаването на Балканския ендемит и терциерен реликт *Haberlea rhodopensis* от листа (15). Интересът към този вид е дългогодишен, но изследванията са изключително в областта на фитохимията и генетиката, като до момента няма цялостен ефективен метод за размножаването му въпреки многобройните опити и някои добри резултати на лабораторно ниво. Сравнителното култивиране на вертикална и хоризонтална аерохидропонни системи и на различни субстрати се увенча с успех, като бе отбелязан висок процент вкореняване и оцеляване на листата (86.7%). Третирането с ИБА стимулира образуването на розетки на вертикалната система, средно 2.9 розетки от лист, но по-голямата част от листата не образуваха розетки. Най-добри резултати бяха получени при предварително вкореняване на листата в перлит и прехвърлянето им на хоризонталната система в ситна агролава, при което 85% от листата образуваха розетки, средно 2.2 на лист. Адаптирането на новите растения в почва и аклиматизацията им в оранжерията са успешни, но растежът е много бавен, което е типично за вида. Наблюдава се образуване и на нови розетки от аклиматизираните растения.

- Успешно бе ускорен растежът на изключително бавно растящи *in vitro* луковички от *Lilium rhodopaeum* чрез прилагане на хидропонно култивиране като втора стъпка на размножаването. Най-добри резултати са получени на система от заливен тип със субстрат перлит, позволяваща развитие на силна коренова система, при което за 8 месеца теглото на луковичките се увеличи 21 пъти (23). Добри резултати са получени и на хоризонталната аерохидропонна система когато в разтвора се добави бактерията *Trichoderma harzianum* за стимулиране на развитието на корените. Някои розетки образуваха и стъбло, а първите 10 растения са успешно адаптирани в почва и последователно пренесени в оранжерията и в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, където след още 2 години някои достигнаха до цъфтеж. Резултатите имат значение и за изясняване на някои моменти от биологията на вида.

- Благодарение на хидропонна система от типа къртинг-борд бе успешно размножена и *Alkanna tinctoria* (17). Синята айважива е лечебно растение, застрашен вид, защитен от Закона за биологичното разнообразие, с практически нулева кълняемост на семената, под 1% в лабораторни *in vivo* и *in vitro* условия. Покълването на максимум 20% от семената бе възможно при стимулиране с гиберелинова киселина и едновременно прилагане на монохроматична светлина, но пониците оставаха твърде хилави. Хидропонната къртинг-борд система бе използвана за бързо заякване на пониците и само след 6 седмици култивиране те образуваха мощни розетки. Растенията бяха адаптирани успешно в саксии с почва във фитотрона, след което пренесени в оранжерията и засадени в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, където достигнаха до цъфтеж.

5. Обучение на кадри и разпространение на резултатите сред обществото.

Това не е обичайно приет принос от научната дейност, но според мен е важно, от една страна поради осигуряването на приемственост в развитието на научното направление, а от друга страна, способства за развиването на екологично съзнание сред хората, които не се занимават пряко с научни изследвания. Включването на доброволци при връщане на *in vitro* размножени растения в техните естествени популации, разпространяването на брошури, книгоразделители, календарчета, с информация за богатството и уникалността на растителното разнообразие в България, под надслов „Спаси ендемит!“ сред хората,

които живеят в близост до редки и застрашени видове растения, повишава тяхната осъзнатост и гордост, както и желанието им да опазват биоразнообразието. Още помня как жителите на с. Проглед ме заплашиха отделеч, като видяха, че влизам в популацията на родопския крем, където ме оставиха колегите, бързайки към друга цел на терен, без да се обадят на кмета. Тогава бях докторантка без опит, за щастие с писмо, в което пишеше, че имам право да събера няколко луковици с цел да размножа този вид – нещо, което веднага преобърна отношението на хората към мен и получих много информация по темата. Разбира се, не всеки стажант и дори не всеки докторант избират да продължат да работят в направлението, в което са се обучавали, много сменят професията си по финансови или други причини, но където и да отидат, носят със себе си това екологично съзнание и оказват влияние в обществото. А за онези, които останат да развиват тематиката на Биотехнологичната лаборатория, си заслужават усилията и извънредния труд, свързани със създаването на материалната база и на връзките с други наши и чуждестранни научни екипи, довело до утвърждаване на нашия екип в международното научно пространство.