

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“

Ася Павлова Кожухарова

**Биотехнологичен подход за опазване и култивиране на
гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.), Fabaceae**

АВТОРЕФЕРАТ

на Дисертация

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител: проф. д-р Марина Станилова

Научен консултант: проф. д-р Страхил Берков

Научно направление: 4.3. Биологични науки

Научна специалност: 01.06.03 Ботаника

София, 2023 г.

Дисертационният труд се състои от 130 страници и включва 48 фигури, 16 таблици, 19 страници списък на цитираните литературни източници с 204 заглавия.

Дисертацията е обсъдена на заседание на колегиума на отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ при Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания и е насочена от НС на ИБЕИ към защита (Протокол № 11 / 29.09.2023).

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 6.12.2023г. от 11:00 часа в заседателната зала в сградата на База 3 на ИБЕИ – БАН, ул. Акад. Георги Бончев, бл. 23, на открито заседание на Научно жури (назначено със заповед на Директора на ИБЕИ-БАН № 75 / 06.10.2023г.) в състав:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Марина Иванова Станилова (ИБЕИ-БАН) – Научен ръководител

Доц. д-р Ина Йосифова Анева (ИБЕИ-БАН) – председател на НЖ

Външни членове:

Проф. д-р Лиляна Руменова Начева – (Институт по овощарство, ССА)

Проф. д-р Антоанета Борисова Трендафилова-Савкова – (ИОХЦФ-БАН)

Доц. д-р Калина Монева Данова – (ИОХЦФ-БАН)

Резерви членове:

Доц. д-р Стоян Стефанов Стоянов – (ИБЕИ-БАН) – вътрешен член

Проф. д-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова – (БФ на ПУ „Паисий Хилендарски“) – външен член

Технически секретар на Научното жури: гл. ас. д-р Малина Христова Делчева

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН на ул. Акад. Георги Бончев, бл. 23 (База 3).

1. Увод

Лечебните растения заемат важно място при лечението и профилактиката на редица заболявания. *Glycyrrhiza glabra* L. (гол сладник) е многогодишно коренищно растение от сем. Fabaceae, чиито лечебни свойства се дължат на корените. Обелени и нарязани, във вид на прах или екстракт, те влизат в състава на различни билкови чайове и лекарствени препарати. Дрогата се прилага както в народната, така и в официалната медицина. Основните биологично-активни вещества, на които се дължат лечебните свойства на *G. glabra*, са тритерпеновия сапонин глициризин и флавоноидите. Глициризинът действа спазмолитично (използва се при астма), отхрачващо (при кашлица, пресипнал глас), капиляроукрепващо, имуноукрепващо, противовъзпалително (ефикасно при възпаления на дихателните пътища, камъни в бъбреците, еритема и кожни инфекции, екзема, псориазис, ревматизъм). Той е 30 до 50 пъти по-сладък от захарта и се използва и като естествен подсладител. Поради някои отрицателни странични ефекти (повишено кръвно налягане, загуба на калий и задържане на натрий), при приготвяне на препарати, чието лечебно действие се дължи на флавоноидите, се използва деглициризиниран екстракт от корени, съдържащ флавоноидна смес. Такива препарати имат главно противовъзпалително действие (при гастрит, стомашни язви, хемороиди), антирадикалово и антиоксидантно действие, свързано с подобряване състоянието на черния дроб.

Поради високата си търговска стойност, видът се отглежда в редица страни. Използват се корените на 3-годишни или по-възрастни растения, тъй като натрупването на основните биологично-активни вещества в тях се повишава значително с възрастта. Разпространението на голия сладник в България е ограничено, като се среща по сухи тревисти места само в Дунавската равнина. В резултат на свръхексплоатация в миналото, находищата му са изтощени, а някои не са потвърдени през последните години. Видът е оценен и категоризиран като застрашен по Червения списък на висшите растения в България и е под строга защита, включен в Приложение 3 на Закона за биологичното разнообразие, като е забранено събирането му от естествените находища. Включен е в Червена книга на Република България с природозащитен статут „застрашен“ вид. Предприети са мерки за *in situ* опазването на *G. glabra*, като част от популацията му влиза в защитени местности (ЗМ „Червеният бряг“ при с. Долни Вит, ЗМ „Палаза“ при с. Коиловци, ЗМ „Чешмата“ при с. Байкал и ЗМ „Находище на обикновен сладник“ при с. Белцов) и в защитени зони от Европейската екологична мрежа НАТУРА 2000. Необходими са допълнителни мерки, като сред препоръките за опазване на голия сладник в България, отбелязани в Червена книга на Р България, са: проучване на състоянието на находищата, на биологията на размножаване и на факторите, повлияващи площта и числеността на популациите, както и съхраняване на семена в Националната семенна банка в гр. Садово и култивиране на вида.

За създаване на насаждение със стопанско значение е необходимо бързо получаване на посадъчен растителен материал. За целта е подходящо прилагането на метода *in vitro* микроразмножаване, при който за кратък период, от ограничен изходен растителен материал (семена, вегетативни органи) могат да се получат стотици растения. В последните десетилетия, благодарение на натрупаните данни от много изследователи за ускорено *in vitro* микроразмножаване на различни растителни видове, се е утвърдило схващането, че по принцип всички видове растения биха могли да бъдат размножени *in vitro*, въпреки че някои са по-трудно податливи от други. Необходимо е експериментално

определяне на най-подходящите изходни експлантати, методи, хранителни среди и условия на околната среда. Често биосинтезата на вторични метаболити намалява в условия *in vitro*, но след *ex vitro* адаптация и аклиматизация на растенията на открито, съдържанието на биологично-активните вещества от интерес е съизмеримо с това в изходните растения. Обикновено генетичната наследственост е с определящо значение както за ефективността на размножаването, така и за биосинтезата, но почвите и микроклиматът също могат да оказват влияние.

Публикуваните досега резултати за *in vitro* регенерация на гол сладник са противоречиви както по отношение на основната оптимална среда, така и по оценката на влиянието на добавените в нея растежни регулатори: вид, количество и комбинации. В повечето публикации се изразява необходимостта от по-нататъшни изследвания за оптимизиране на процесите. В тази връзка, в настоящия дисертационен труд са приложени биотехнологични подходи, целящи създаване на протокол за бързо размножаване на *G. glabra*, като същевременно е направен опит за изясняване значението на произхода на растенията и на абиотичните фактори за биосинтеза на вторичните метаболити от интерес.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е експериментално определяне на подходящите условия за ефективно *in vitro* култивиране и *ex vitro* адаптация на *Glycyrrhiza glabra* и анализ на основните биологично активни вещества в изходните форми и в *ex situ* адаптираните растения.

2.2. Задачи

За постигане на поставената изследователска цел бяха планирани следните задачи:

1. Събиране на растителен материал (семена и корени) от български находища на гол сладник за инициране на *in vitro* култури и за фитохимични анализи;
2. Изследване на жизнеността на семената и на кълняемостта им при условия *in vivo* и *in vitro*;
3. Инициране на *in vitro* култури от семена и от вегетативни пъпки;
4. Субкултивиране и изследване на видовите особености в условия на дългосрочна *in vitro* култура;
5. Изследване влиянието на състава и типа на хранителните среди, както и на условията на околната среда (осветление, температура, култивационни съдове);
6. Сравнение на ефективността на различни *in vitro* техники за ускорено размножаване;
7. *Ex vitro* адаптация при контролирани условия във фитотрон;
8. Определяне съдържанието на глицирзинова киселина и общи флавоноиди в корените на растения от различни естествени находища и на растения, култивирани в *ex situ* колекцията.

Допълнителни изследвания извън планираните задачи:

1) Свързани с изпълнение на проект по Програма за подпомагане на млади учени и докторанти в БАН – 2017 г. с ръководител А. Кожухарова

- Опити за индуциране на коренова *in vitro* култура от типа *hairy root*.
- Анализ на състава на почвите от естествените находища и от *ex situ* колекцията на ИБЕИ, във връзка с евентуално влияние на почвата върху съдържанието на БАВ.

2) Задачи, изискващи повече технологично време, чието изпълнение стана възможно благодарение на периода след отчисляването ми от докторантура.

- Аклиматизация на *in vitro* получени растения в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, с произход Белцов, Коиловци, Долни Вит и Украйна.
- Връщане на *in vitro* размножени растения в известно находище.

3. Материали и методи

3.1. Изходен растителен материал

За изпълнение на поставените задачи е използван растителен материал от 4 български популации на *Glycyrrhiza glabra* от Дунавската равнина, събран в периода 2015-2018 год., в количества съгласно Разрешителни на МОСВ с № 655/07.12.2015 г. и № 719/29.08.2017 г.

Със съдействието на „Биопрограма“ ЕАД и на Проект за подпомагане млади учени, от всяко находище са осигурени семена от 6 индивида и корени от 2 индивида, без растенията да бъдат унищожени. Корените са събрани във фаза плодоношение (юли-август) и във фаза цъфтеж (юни-юли) (Табл. 1).

В допълнение, като референтни произходи са използвани корени и семена от растения със стопанско значение от Украйна и корени от Узбекистан, събрани през есента във фаза плодоношение, любезно предоставени ни от Биопрограма ЕООД.

Семената са използвани за инициране на *in vitro* култури и за определяне на техните кълняемост и жизненост. Корените са използвани за фитохимични анализи, които включват получаване на екстракти от растителния материал, определяне на глициризиновата киселина чрез хроматографски методи (количествен HPLC метод), както и TLC и спектрофотометрично определяне на общите флавоноиди. Резници от столони са използвани за получаване на растения за *ex situ* колекцията на ИБЕИ и за получаване на вегетативни пъпки за инициране на *in vitro* култури.

Табл. 1. Събран изходен материал от *Glycyrrhiza glabra*

Находище, GPS координати	2015	2016	2017	2018
	фаза плодоношение	фаза плодоношение	фаза плодоношение	фаза цъфтеж
Белцов, 43.59176°N; 25.60944°E Русенска област, община Гулянци	корени, столони и семена	корени и столони	корени и столони	корени
Коиловци, 43.46009°N; 24.78099°E Плевенска област, община Плевен	корени, столони и семена	корени, столони и семена	корени, столони и семена	корени
Долни Вит, 43.65861°N; 24.75902°E Плевенска област, община Плевен	корени, столони и семена	корени, столони и семена	корени, столони и семена	корени
Байкал, 43.71154°N; 24.40344°E Плевенска област, община Долна Митрополия			корени	корени

3.2. Методи



* Допълнителни задачи, извън заложените в индивидуалния план (свързани с изпълнение на проект по Програма за подпомагане на млади учени и докторанти в БАН – 2017 г.), са отбелязани с пунктир.

3.2.1. Кълняемост на семената

Първото изследване за кълняемост на семена от гол сладник при *in vitro* лабораторни условия е проведено със 154 семена от произход Долни Вит: 50 бр. нетретирани семена веднага след събирането им; 50 бр. семена след 2-месечен престой в хладно помещение при 10 ± 5 °C и 54 бр. семена след последователна температурна стратификация (2 месеца при 10 ± 5 °C и 10-кратно потапяне за 5 секунди последователно в ледена и вряла вода, непосредствено преди дезинфекцията и залагането на семената на хранителна среда).

За сравнително изследване на кълняемостта на семената от трите български произхода (Долни Вит, Коиловци и Белцов) бе проведен двукратен опит след 8 месеца съхранение на семената при стайна температура: по 75 семена от находище (3 повторения по 25 семена). Непосредствено преди дезинфекцията и залагането на семената на хранителна среда, те бяха стратифицирани чрез 10-кратно потапяне за 5 секунди последователно в ледена и вряла вода. Отчетени са % на оцелелите от микробиялно замърсяване семена, % на покълналите семена със зародишно коренче (от всички заложили семена) и % високи понци с котиледони и няколко двойки същински листа, с височина 9-10 cm (изчислен спрямо броя на покълналите семена).

В опити за повишаване на кълняемостта на семената в *in vitro* условия е проведено третиране с два растежни регулатора като химични стимулатори: потапяне в разтвори на 0.35% Гиберлинова киселина (GA3) и 0.1% Кинетин (6-Furfuryladenine, с по-често използвано съкратено наименование Kin) за 21 часа. За всеки растежен регулатор са използвани по 50 семена (2 повторения по 25 семена).

Семената са дезинфекцирани по стандартна процедура и заложени на основна MS среда (Murashige & Skoog, 1962), допълнена с 30 g/l захар. За втвърдяване на средата е добавен 6.5 g/l агар (Plant agar, Duchefa, NL). Средата е стерилизирана чрез автоклавиране при стандартни условия: 20 мин. при 121 °C и налягане 1 bar.

Средата е разлята в пластмасови култивационни съдове (контейнери с решетки, Duchefa, NL) и във всеки контейнер са поставени по 25 семена. Следвайки същата процедура, са направени два последователни опита, от по 75 семена от всяко находище (3 повторения по 25 семена всяко). Контейнерите са поставени във фитостатно помещение с постоянна температура 23 ± 2 °C и светлинен режим 16 h светлина 2000 lx и 8 h тъмнина.

За определянето на кълняемостта *in vivo* са използвани семена от популацията край с. Белцов, поставени в петриеви блюда с навлажнена филтърна хартия, по 15 семена в петри, в 2 повторения, след същата стимулация с вряла и ледена вода и при същите условия на околната среда. Като допълнителен тест за кълняемостта, са заложени по 15 семена в петри в почвена смес от почва:кокосови фибри:пясък в съотношение 2:1:1, във фитотрон с температура около 25 °C и смесено естествено и изкуствено осветление. Всички опити за покълване на семената *in vivo* са извършени 8 месеца след събирането им.

Енергията на кълняемост е представена като най-висок процент покълнали семена на седмична основа. Покълналите семена са отчитани два пъти седмично (3 x 25 семена от произход) до 4 седмици след последното покълнало семе.

3.2.2. Жизненост на семената

За оценка на жизнеността на семената е приложен бърз 24-часов тетразолов тест (Peters, 2000). Заложени са 50 семена от всяка от популациите край селата Белцов, Коиловци и Долни Вит. Жизнеността се отчита в проценти, в зависимост от интензитета на оцветяване на зародишите след тестването, съгласно критериите за интерпретиране на резултатите от Тетразоловия тест, дадени от Moore (1985).

3.2.3. *In vitro* култивиране

3.2.3.1. Дезинфекция на изходния растителен материал

Дезинфекцията на семената протича по стандартна процедура, в следните стъпки: последователно накисване в 70% етанол в продължение на една минута и в неразредена търговска белина „Аче“ (NaClO, Cl <5%) за 10 минути, последвано от трикратно промиване по 10 мин. с дестилирана стерилна вода.

Дезинфекцията на вегетативните пъпки образувани от култивираните резници от столони, протича с предварителното им накисване в мъртва вода с рН ~ 3.8 8 (анолит, получен чрез електролиза на водата в активатор на вода ДА-3М) с добавен NaCl и няколко капки детергент и разбъркване на клатачка за 15 мин., последвано от трикратно промиване на пъпките с жива вода с рН ~ 9.2 (католит, получен при електролизата на водата),

накисване в 70% етанол в продължение на една минута и в неразредена търговска белина „Аче“ (NaClO, Cl <5%) за 10 минути, и трикратно промиване по 10 мин. с дестилирана стерилна вода.

Дезинфекцията на **стъбла, дръжки, междувъзлия и листа** протича по сходен начин. Експлантите предварително се накисват за 10 мин. в детергент, последвано от обилно измиване под течаща вода. Следва накисване в 70% етанол в продължение на една минута и в неразредена търговска белина „Аче“ (NaClO, Cl <5%) за 10 минути, последвано от трикратно промиване по 10 мин. с дестилирана стерилна вода.

3.2.3.2. Хранителни среди

При първоначалните опити за въвеждането на семена от гол сладник в *in vitro* култура се използва основна среда MS (Murashige & Skoog, 1962), с 30 g/l захар, и се допълва с 6.5 g/l агар Plant (Duchefa, NL). Всички среди са с рН в границите на 5.7-5.8 и автоклавирани при 121 °C и налягане 1 atm за 20 минути.

В зависимост от целта на култивирането към основните среди са добавяни растежни регулатори, като е изпитано влиянието на 4 цитокинина: 6-фуруриладенин (**Kin**), 6-бензиламинопуриин (**BAP**), мета-тополин (**MT**) и тидиазурон (**TDZ**) и 3 ауксина: β -индолил-3-маслена киселина (**IBA**), α -нафтилоцетна киселина (**NAA**) и 2,4-динитрофенилгидразин (**2,4-D**), в различни комбинации и концентрации. За контрола винаги е използвана основна среда MS с 30 g/l захар. При третото субкултивиране във всички тествани среди е добавен 1 mg/l активен въглен.

Табл. 2. Състав на изпитаните хранителни среди

Среди	Растежни регулатори [mg/l]						
	Kin	BAP	MT	IBA	NAA	TDZ	2,4-D
K1	1						
K1I ₅	1			0.5			
K1N ₅	1				0.5		
B1		1					
B2I ₁		0.2		0.1			
B5N ₅		0.5			0.5		
MT1			1				
MT1I ₅			1	0.5			
MT1N ₅			1		0.5		
MT ₁ I ₁			0.1	1			
I1				1			
I2				2			
I1K ₁	0.1			1			
I2K1	1			2			
I1MT ₁			0.1	1			
K ₅ T ₂ D ₂	0.5					0.2	0.2

3.2.3.3. Субкултивиране

In vitro получените поници и корени се нарязват на сегменти от 1.5-3.0 cm и се залагат паралелно на три хранителни среди: K1, K1I₅ и K1N₅ (Табл. 2) и MS контролата, докато кореновите сегменти се поставят върху среда П1.

Всички *in vitro* култури се отглеждат в култивационно помещение (фитостатна) при температура от 23 ± 2 °C и денонощен режим 16 h / 8 h светлина/тъмнина, с интензивност на светлината 2000 lx.

На получените *in vitro* поници и регенеранти се прилагат последователни субкултивирания, при които растенията се нарязват на сегменти и получените вторични експлантати се поставят на свежа среда със същия състав, с продължителност 4 и 8 месеца.

Сравнен е размножителният коефициент на *in vitro* култури от 3 български произхода (Белцов, Коиловци и Долни Вит), и на 1 референтен произход (Украйна), на хранителни среди с различен състав.

Броят на изходните *in vitro* поници при трите български произхода е по 26 за Белцов и Коиловци и 15 за Долни Вит. От тях при първото субкултивиране са получени различен брой вторични експлантати за изпитаните произходи (147 за Белцов, 119 за Коиловци и 67 за Долни Вит), които са равномерно разпределени върху среди K1, K1I₅ и K1N₅ и MS контролата.

3.2.3.4. Коренообразуване, калусообразуване и соматична ембриогенеза

За вкореняване на получените *in vitro* растения (облистени стъбла), са изпитани хранителни среди, съдържащи само ауксин или комбинация от ауксини и цитокинини в различни концентрации: П1, П2, П1К₁, П2К₁ и П1МТ₁, с или без добавен 1 g/l активен въглен.

За индуциране на калусови *in vitro* култури като изходен материал са използвани междувъзлия, стъблени дръжки, корени и листа (с адаксиалната и абаксиалната повърхност към средата). Изпитани са среди П1, П2, К₅Т₂Д₂ и П1МТ₁. Заложени са по 5-6 експлантата от произход, на всяка изпитана среда, в няколко повторения.

Тествана е и възможността за индуциране на соматична ембриогенеза като са използвани сегменти от нарязани *in vitro* получени корени и части от нарязан калус. Изпитаната среда е без растежни регулатори, с удвоено количество захар – 60 g/l (среда MS60).

3.2.3.5. Опити за получаване на *hairy-root* коренова култура посредством щам на *Agrobacterium rhizogenes*

За индуциране на коренова култура от типа *hairy-root* бе закупен щам на *Agrobacterium rhizogenes* от Институт Лейбниц DSMZ – Германска колекция от микроорганизми и клетъчни култури GmbH. Изпробван е протокол за генетична трансформация с *A. rhizogenes* с използване на ултразвук. Като изходен материал се използва стерилна *in vitro* култура от *G. glabra* и по-конкретно листа, стъбла, корени и калуси на *in vitro* растения. Експлантите се получават чрез нарязването им на малки сегменти.

3.2.4. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация

3.2.4.1. *Ex vitro* адаптация

Растенията се засаждат в саксии с диаметър 8 cm с почвен субстрат в съотношение (2:1:1, почва:кокосови фибри:пясък).

Ex vitro адаптацията към нестерилни условия и почва протича в 2 етапа:

При първия етап растенията са в климатичен шкаф (POL-EKO-APARATURA КК350) със стриктно зададен контрол на температурата, осветлението и относителната въздушна влажност (плавно намаляване на влажността от 90% до 60% с цел адаптиране на растенията към близка до естествената среда). Вторият етап протича във фитотронно помещение с по-широка амплитуда на стойностите на тези три параметъра на околната среда.

3.2.4.2. Аклиматизация

Аклиматизацията на растенията също е на два етапа: към условията на неотопляема оранжерия и на открито, в опитните площи на ИБЕИ. Растенията се пресаждат в по-големи саксии и се пренасят в неотопляема оранжерия. Изнесени са общо 185 *in vitro* растения от трите български произхода (13 от Долни Вит, 57 от Коиловци, 5 от Белцов) и 110 от референтния произход Украйна, в продължение на няколко месеца.

3.2.5. Фитохимични анализи

3.2.5.1. Подготовка на пробите.

За всички фитохимични анализи е направена предварителна обработка на корените, като от всяко находище е приготвена една обща проба за всяка от изследваните фенологични фази. Корените са промити с вода, нарязани на малки парчета и след това са изсушени в сушилня при 55 °C до постоянно сухо тегло. Изсушените корени са смлени на фин прах в кафемелачка.

3.2.5.2. Получаване на метанолови екстракти от корени

Получени са метанолови екстракти от корени от 4 български популации на гол сладник, събрани през фази цъфтеж и плодоношение, както и от корени от референтните произходи с комерсиално значение извадени по време на плодоношението.

3.2.5.3. Определяне съдържанието на глициризинова киселина

Съдържанието на глициризин е определено хроматографски в метаноловите екстракти, чрез HPLC (UV / VIS детектор, LC-85B, Perkin Elmer) както е описано в Kozhuharova et al. (2019), в три паралелни проби на популация.

3.2.5.4. Определяне на общи флавоноиди

Метаноловите екстракти са изследвани чрез тънкослойна хроматография (TLC) за определяне на неполярни (агликони) и полярни (гликозиди) флавоноиди и за визуална полуколичествена оценка.

Общите флавоноиди са определени спектрофотометрично (Jenway 6320 D) съгласно Европейската фармакопея (European pharmacopoeia 7. Strasbourg: Council of Europe, 2010, p.1072) в три паралелни проби на популация, съответно на произход от *ex*

situ колекцията. Процентът съдържащи се флавоноиди в пробата, изразен като хиперозид, се изчислява по уравнението:

$$A \times 1.25/m$$

A = абсорбция на пробата при 425 nm; m = маса на растителния материал

3.2.6. Статистическа обработка на резултатите

Статистическата обработка на данните от фитохимичния анализ е направена с използването на дисперсионен анализ Excel ANOVA (Anova Single factor, Anova: Two-Factor With Replication).

3.2.7. Почвени анализи

Като допълнителна задача, разширяваща обхвата на дисертационния труд, бе направен и почвен анализ (механичен и химичен състав на почвата) от четирите известни находищата, както и на почвата на опитната площ на ИБЕИ-БАН (анализът е извършен от фирма Ник Агро сървис ООД).

Направено е измерване на рН на въздушно сухи почвени проби, съгласно ISO 10390, 1:5 (w:v), по метода ISO 10390:2005 Soil quality - Determination of pH <https://www.iso.org/standard/40879.html>.

4. Резултати и обсъждане

4.1. Събиране на изходен растителен материал

Потвърдени са находищата и е събран растителен материал от 4 български находища на *Glycyrrhiza glabra* в Дунавската равнина, известни по литературни данни: в близост до селата Белцов, Коиловци, Долни Вит и Байкал. Това са всички оцелели понастоящем популации от гол сладник в България. За инициране на *ex situ* колекция и на *in vitro* култури бяха събрани както подземни столони, така и семена, което съответства на информацията, намерена в научната литература.

4.2. Наблюдение на българските находища от гол сладник

Българските находища на гол сладник бяха посещавани в продължение на четири последователни години.

Находището при с. **Белцов** е в защитена местност „Находище на обикновен сладник” с площ 0.29 хектара, обявено със Заповед No.РД-1635 от 27.05.1976 г. Първоначалното му разположение е било в низината, но с течение на годините се е разраснало нагоре по хълмистата част на терена. В момента се е запазила само една тясна ивица с ширина от 10 – 20 m, между ежегодно обработвани ниви, като отделните индивиди растат между дървета и храсти.

Находището при с. **Коиловци** е в защитена местност „Палаза“ с площ 0.52 хектара, обявено със Заповед No.РД-1187 от 19.04.1976 г. При откриването му е било заградено с ограда, обозначаваща границите му, което ни позволи да установим, че се разраства и на места е преминало извън огражденията. Находището е във видимо добро състояние.

Находището при с. **Долни Вит** е разположено в защитена местност „Червеният бряг“ с площ 0.33 хектара, обявена със Заповед No.РД-1187 от 19.04.1976 г. Теренът на

местообитанието е песъчлив като на места се наблюдава ерозия. През всичките години на наблюдение състоянието на индивидите в находището бе добро. Отбелязано бе обилно семеобразуване както от индивидите по периферията, така и от тези във вътрешността му.

Находището при **с. Байкал** е разположено в защитена местност “Чешмата” с площ 0.2 хектара, обявено със Заповед No.РД-97 от 13.03.1978 г. Обитава малка площ в двора на местната помпена станция. Считало се е за изчезнало, но с помощта на колегите от РИОСВ – Плевен успяхме да го намерим. При посещението ни през юни 2018 бе установен цъфтеж на растенията, но при повторното ни посещение през септември 2018 г. бе установено неговото косене, което е забранено в границите на защитената местност съгласно Заповед No.РД-714 от 10.06.2003 г., публикувана в бр. 60/2003 на Държавен вестник.

По данни на РИОСВ – Плевен, находищата са се свивали с годините поради прекомерно използване, което вероятно е и причината за изчезването на находището край гр. Никопол, с. Сомовит, разположено в защитена местност “Плавала” с площ 28.1 хектара, обявено със Заповед No.РД-1187 от 19.04.1976 г.

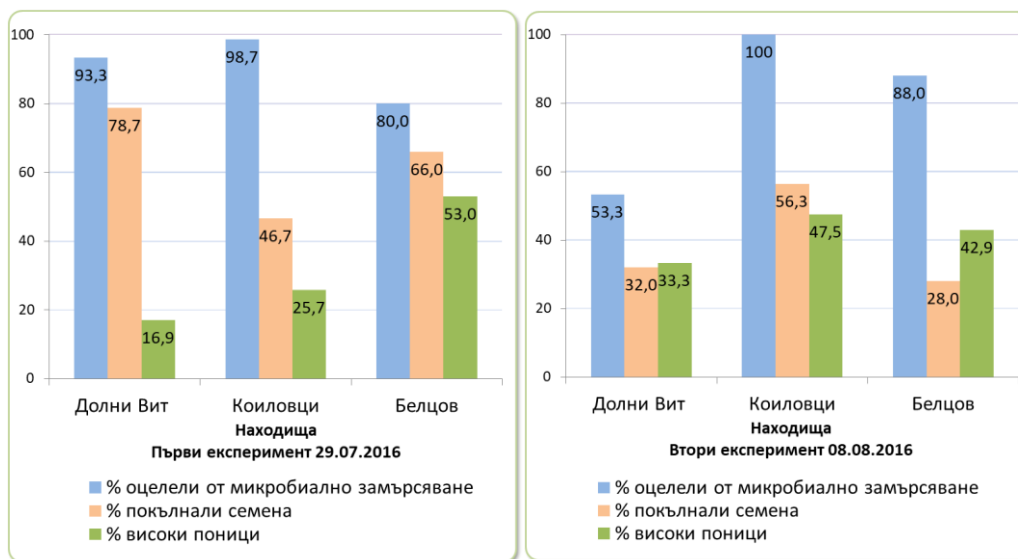
4.3. Кълняемост на семената

При първия опит *in vitro*, със семена от Долни Вит, бе наблюдавано тежко замърсяване с плесени, при което оцеляха $27.0 \pm 0.1\%$ семена. Кълняемостта на нестимулираните семена бе нулева, а след 2-месечна стратификация при 10 ± 5 °C, от 50 семена покълнаха $12 \pm 0.5\%$ от оцелелите (под 2% от всички заложили семена), но семеначетата не успяха да се развият и некротизираха.

Последователното третиране с вряла и ледена вода при втория опит с 54 семена от същия произход, след 2 месеца стратификация при 10 ± 5 °C, доведе до успешното покълване на 6 семена (11.1%), които образуваха добре оформени стъбла, притежаващи листа. Появата на лилави ексудати в средата показва началото на покълването на семената. Процесът не е едновременен, около една трета от всички семена развиваха хипокотили още през първата седмица, докато общият период на покълване на семената продължи около шест седмици.

Допълнителното съхранение на семената с произход Долни Вит за половин година при стайна температура доведе както до намаляване на замърсяването с плесени (оцелели 73.3%), така и до стимулиране на покълването на семената (покълнали 42.7%).

През лятото на 2016 г. бе проведен опит със семена от трите находища, двукратно по 75 семена от находище в 3 повторения по 25 семена, при същата стратификация с кипяща и ледена вода. Ефективността на стерилизацията бе много висока, въпреки че се наблюдаваха известни различия, свързани с находищата, а между двата експеримента бяха отбелязани някои колебания (Фиг.1). Степента на покълване варира между 28% и 78.7% от всички заложили семена.



Фиг. 1. Ефективност на стерилизацията на семената и на покълването им и относителен брой високи понци за трите находища (вляво: първи опит, начало 29.07.2016 г.; вдясно: втори опит, начало 08.08.2016 г.)

Отчетеното вариране в степента на покълване на семената от трите популации при двата опита, проведени през лятото на 2016 г., може да се дължи на някоя от следните причини: физичен покой на семената поради твърдата им обвивка, ниска жизнеспособност на семената и относително малък брой семена при всяка обработка. Броят на събраните семена от диворастящите находища е в съответствие с мерките за опазване, предвидени в Закона за биологичното разнообразие на България за видове със статут „застрашен вид“.

За сравнение, при опита, проведен в условия *in vivo* в петрита с навлажнена филтърна хартия (общо 30 семена) с произход Белцов, процентът на оцелелите от микробиални инфекции е по-висок: 93.3%, но само 13.3% (4 бр.) покълнаха, след което бяха прехвърлени в саксийки с почвен субстрат във фитотрона. Впоследствие, 3 загинаха и само 1 растение укрепна. По-добро покълване при условия *in vitro* в сравнение с *in vivo* в петриеве блюда с навлажнена филтърна хартия, е съобщено и за други видове (Catana et al., 2013).

Семената, заложи в почвена смес от почва, кокосови фибри и пясък в съотношение 2:1:1, не покълнаха.

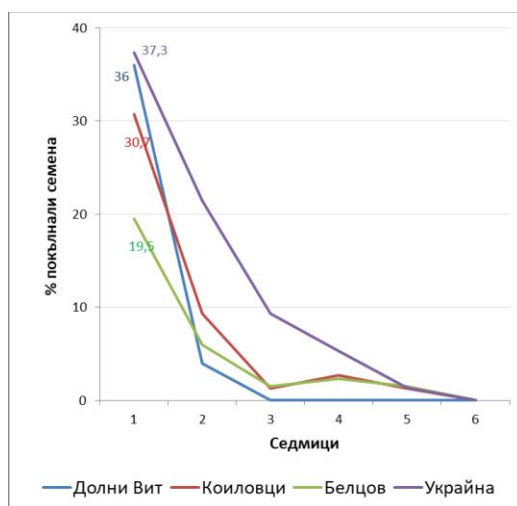
При опитите за повишаване на кълняемостта чрез третиране на семената с химични стимулатори (по 2 кофички x 25 бр. семена, накиснати в 0.35% разтвор на GA₃ или 0.1% разтвор на Kin за 21 ч.) получените резултати са с близки стойности и показват, че 17.5 % от семената оцеляват, но няма покълнали, поради което тези химични стимулатори не бяха използвани повторно.

Нашите опити показаха, че семената на *G. glabra* имат комбиниран физичен и физиологичен покой. По тази причина прекъсването на физичния покой чрез третиране с ледена и вряла вода на пряко събрани семена доведе до 11% кълняемост, докато при прилагането на същото третиране след 6-месечно съхранение на семената при стайна температура процентът на покълналите семена се повиши до 78% благодарение на прекъсването и на физиологичния им покой. Заслужава да се отбележи, че пролетта е

времето за сеитба на женско биле. През декември бобовите със семена все още бяха прикрепени към растенията, което вероятно е свързано с необходимостта от повече време за достигане на зрялост и едва след прекъсване на физиологичния им покой падат на земята.

За два месеца култивиране върху твърда среда с агар MS, 67 от пониците достигнаха височина от 10 cm и образуваха средно между 10 и 12 листни делчета. Някои индивиди се разклониха и броят на листните делчета се увеличи до 18; корените също се различаваха по своя растеж и разклонения, като най-големите достигнаха над 15 cm дължина. Останалите покълнали семена имаха нужда от повече време за да се развият в растения. Така получените *in vitro* растения бяха използвани като източник на експланти за продължително субкултивиране.

Изследвана бе и енергията на кълняемост (при 75 семена от произход), като броят на покълналите семена е отчитан два пъти седмично. Семената започват да кълнат още на третия ден, като при всички произходи през първата седмица покълват най-голям брой семена. Покълването приключва в края на 5-тата седмица, с изключение на произход Долни Вит, при който то е в рамките на 3 седмици. Енергията на кълняемост е най-висока при семената от Долни Вит и референтните семена от Украйна (37.3% и 36%, респективно), а най-ниска при семената с произход Белцов (19.5%) (Фиг. 2). Процентът на всички покълнали семена е най-висок при референтния произход Украйна (74.7%), следван от тези на произход Коиловци (45.3%), Долни Вит (38%) и Белцов (30.8%).



Фиг. 2. Енергия на кълняемост *in vitro* при семена с различен произход на среда MS, за 6 седмици.

4.4. Жизненост на семената

В резултат на оцветяването на зародишите след прилагане на тетразоловия тест за жизненост, тестваните семена от трите изследвани популации (Белцов, Коиловци и Долни Вит) бяха групирани в класове в зависимост от степента на оцветяването им от тетразоловия разтвор:

- Клас I – зародиши оцветени в червено;
- Клас II – зародиши оцветени в розово;

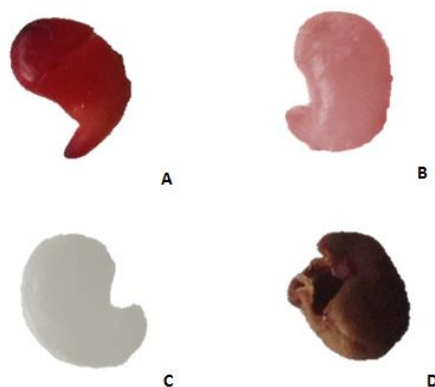
- Клас III – неоцветени зародиши.

Бяха установени и семена без зародиши, отделени в четвърти клас:

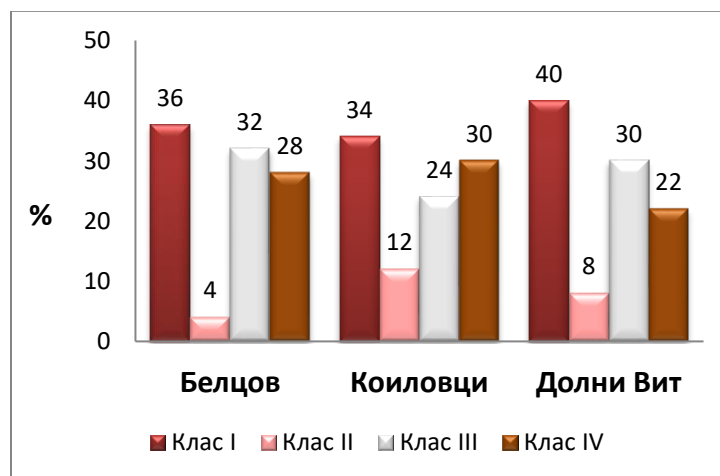
- Клас IV – празни семена.

Качествената оценка и процентното съотношение на семената / зародишите са представени на Фиг. 3 и Фиг. 4.

Съгласно критериите на Мооге (1985) за интерпретиране на резултатите от Тетразоловия тест, като жизнени бяха оценени семената / зародишите от Клас I и Клас II. В резултат, процентът жизнени семена при трите популации е съответно: 40% при популацията от с. Белцов, 46% при популацията от с. Коиловци и 48% при популацията от с. Долни Вит.



Фиг. 3. Качествена оценка на жизнеността на семената след тестване с Тетразолов тест: **A**- жизнени зародиш (оцветен в червено), **B** - жизнени зародиш (оцветен в розово), **C** - нежизнен зародиш (неоцветен), **D** – празно семе.



Фиг. 4. Процентно разпределение на семената (зародишите) в класове, в зависимост от оцветяването от тетразоловия разтвор: Клас I – зародиши оцветени в червено; Клас II – зародиши оцветени в розово; Клас III – неоцветени зародиши; Клас IV – празни семена.

5.5. *In vitro* култивиране

5.5.1. Дезинфекция на изходния растителен материал и инициране на *in vitro* култури

Предварителното съхранение на семената за половин година, в комбинация с приложената стандартна дезинфекция, повиши процента на оцелелите от микробиялно замърсяване семена и направи възможно иницирането на *in vitro* култури от трите български произхода и от референтния произход от Украйна.

Веgetативните растителни органи по принцип се дезинфекцират по-трудно, особено ако са събрани от естествените популации. По тази причина засадохме събраните от находищата резници от столови в саксии с почва, които след няколко месеца във фитотрона или в оранжерията развиха млади вегетативни пъпки и цели растения, подходящи за източник на растителен материал за *in vitro* размножаване. От тях бяха взети вегетативни пъпки (24 броя), листа, стъбла и стъблени междувъзлия за инициране на *in vitro* култури.

При голия сладник обаче, стандартната стерилизация се оказа недостатъчна и за осигуряване на стерилни експлантати се наложи въвеждане на предварителна допълнителна стъпка: накисване в „мъртва вода“ (анолит, получен чрез електролиза на водата) с рН 3.8 + 1 капка веро за 2 ч. за обеззаразяване, последвано от накисване в „жива вода“ (католит, получен чрез електролиза на водата) с рН 9.5 за 15 ч. за предотвратяване на негативните ефекти на мъртвата вода върху растителните тъкани, но това също не доведе до повишаване на оцелелите експлантати.

Веgetативните пъпки се развиваха много бавно в *in vitro* условия, с удебеляване в долната част и впоследствие спираха да нарастват, като повечето некрозираха. В отделни случаи бяха получени калуси и корени от листа.

5.5.2. Субкултивиране и влияние на състава на хранителните среди върху размножителната способност и *in vitro* вкореняването

След двумесечно култивиране върху твърда среда MS големите поници бяха субкултивирани, а останалите бяха пренесени на свежа MS среда без да бъдат нарязвани. При първото субкултивиране, от *in vitro* пониците бяха получени вторични експлантати: сегменти от корени и стъблени сегменти (врѳхчета и междувъзлия с 1-2 листенца) (Фиг. 18). Най-добрите резултати са свързани с находището при с. Белцов, с коефициент на размножаване 5.7 ± 1.4 стъблени експлантати от поник (Табл. 3).

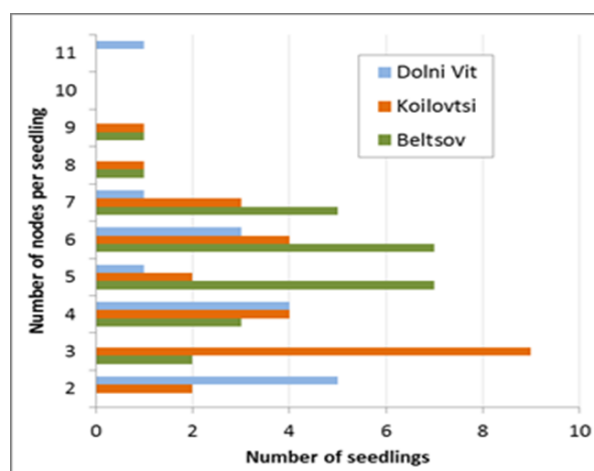
Растенията с добре развити корени образуват повече възли и листа и от тях могат да се изрежат по-голям брой нови експлантати. Така почти всички *in vitro* растения с произход Белцов нараснаха бързо и образуваха между 3 и 9 междувъзлия, като при 14 от общо 26 броят им беше 5-6, докато тези с произход Коиловци и Долни Вит бяха по-дребни, като преобладаваха *in vitro* растенията с 2 до 4 междувъзлия (Фиг. 5). Неравномерният растеж се изразява и в различен брой листенца на поник: от 12.6 ± 5.9 за Коиловци до 18.7 ± 6.9 за Долни Вит.

При повторно събиране на семена от същите находища на следващата година (2017) и изпитване размножителната ефективност на стъблени експлантати от *in vitro* поници на основна MS среда, резултатите бяха сходни (Фиг. 6). Беше изпитан и

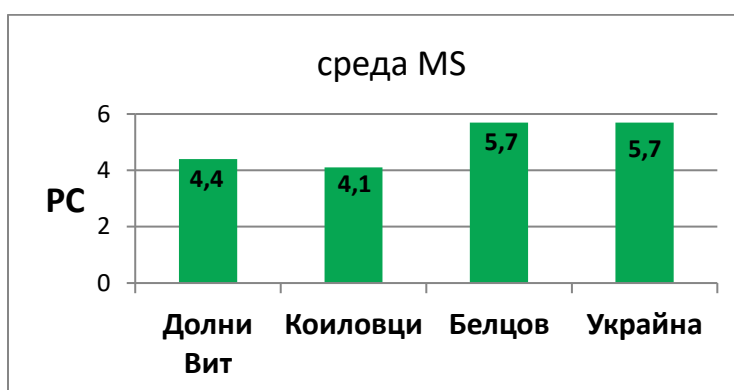
референтен произход от Украйна, при който резултатите бяха съизмерими с тези при *in vitro* културата от Белцов.

Табл. 3. Коефициент на размножаване (РС) на първото *in vitro* субкултивиране, 2 месеца след залагането на семената и ефективно коренообразуване, на среда MS без растежни регулатори.

Находище	Брой субкултивирани понци	Понци с дълги корени [%]	РС
Долни Вит	15	53.3	4.5 ± 2.5
Коиловци	26	65.4	4.6 ± 1.9
Белцов	26	84.6	5.7 ± 1.4



Фиг. 5. Разпределение на понциите от трите находища според броя на междувъзлията, образувани за 6 седмици на среда MS.



Фиг. 6. Коефициент на размножаване на стъблени експланти от *in vitro* понци с произход Долни Вит, Коиловци, Белцов и референтен от Украйна, на среда MS, за срок 6 седмици.

С цел изпитване влиянието на състава на хранителните среди върху скоростта на растежа и типа на развитие на *in vitro* културите, още при първото субкултивиране стъблените вторични експлант бяха поставени на хранителни среди с добавени растежни регулатори: цитокинините Kin и BAP самостоятелно, в концентрация 1 mg/l (среди K1 и B1), както и в комбинация с ауксините IBA и NAA в различни концентрации: среди K1I₅ и K1N₅, съдържащи Kin (1 mg/l) в комбинация с ауксините IBA или NAA (0.5 mg/l) и среди B₂I₁ (0.2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) и B₅N₅ (0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA). Кореновите вторични експлант бяха поставени на среда I1, съдържаща 1 mg/l IBA.

На всички изпитани среди, съдържащи Kin, стъблените сегменти се удължиха и развиха множество нови зелени листенца, докато първоначалните листа етиолираха и загинаха. Повечето издънки образуваха калус под основата си. В зависимост от състава на хранителната среда бяха отбелязани и различия в развитието на стъблените експлант (Фиг. 7). На среда K1 много от експлантите образуваха по 1-2 нови издънки, с малки добре оформени зелени листенца, без корени и с малко калус. На среда K1I₅ експлантите не образуваха нови издънки, но останаха зелени и имаха нормални листа, като повечето развиха корени, някои от които мощни. При среда K1N₅ издънките бяха по-малко жизнеспособни: тънки, издължени, с мънички листенца и много калус в основата, а някои от тях проявиха признаци на витрификация, обезцветиха се и загинаха. Образуването на къси кафеникави корени бе рядко, съпътстващо калусогенезата.

На всички среди, съдържащи BAP, стъблените сегменти, след първоначално слабо удължаване, некротизираха и изсъхнаха, поради което при следващите субкултивирания този цитокинин не беше използван.

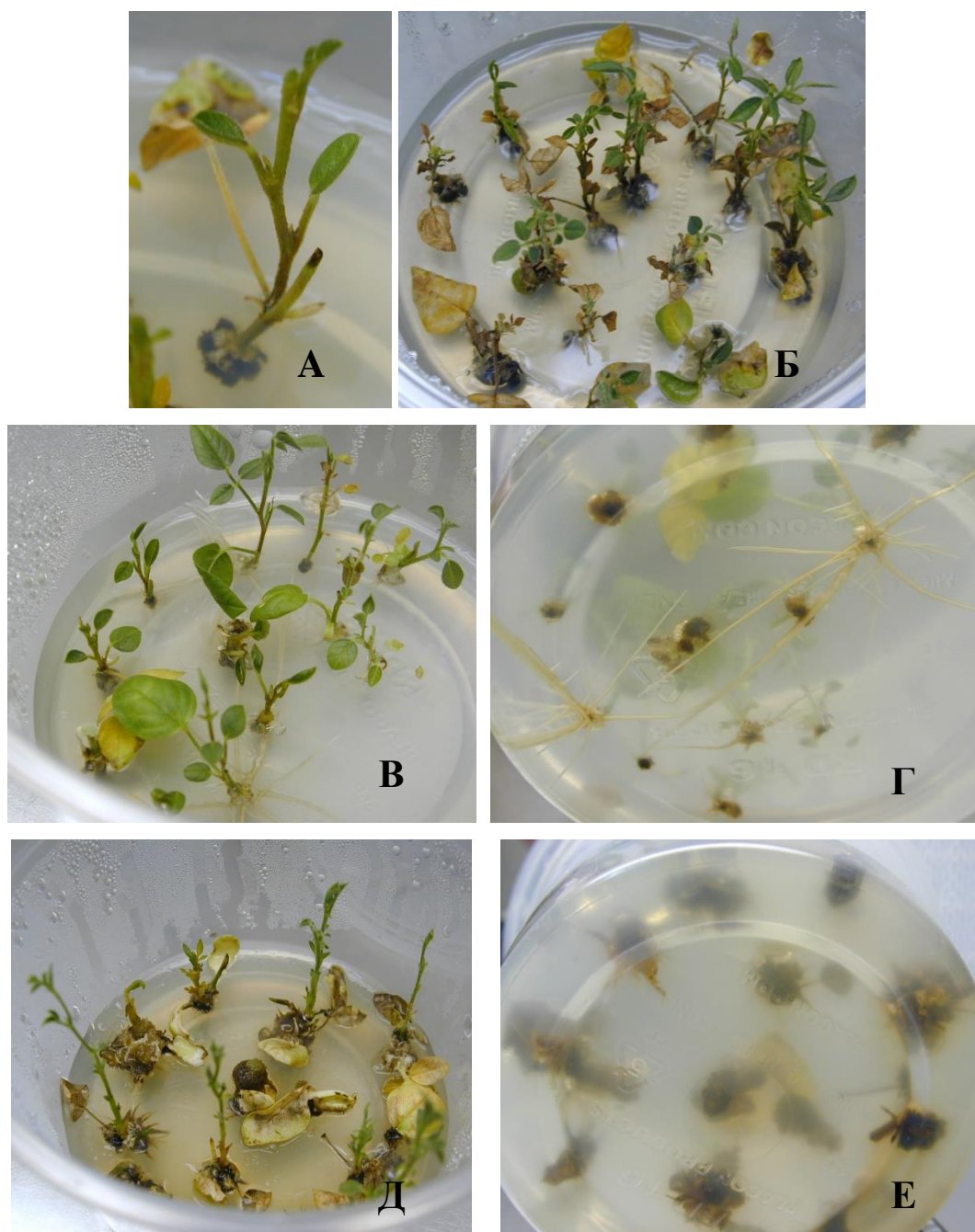
Второто субкултивиране на част от издънките бе извършено след 4 месеца култивиране, а на останалите – след 8 месеца, на същите хранителни среди, с цел сравняване ефективността на *in vitro* размножаването под влияние на изпитаните растежни регулатори в зависимост от срока на култивиране. Резултатите при отделните производи са представени на Фиг. 8.

G. glabra е сравнително бавно растящ вид в *in vitro* условия, като при 2 от произходите (Долни Вит и Коиловци) е по-ефективно култивирането за по-дълъг период от време. (Фиг. 8 А, Б). Като най-подходяща за вида среда е избрана K1I₅, на която качеството на регенерираните растения е най-добро и повечето растения образуват корени, които се разклоняват.

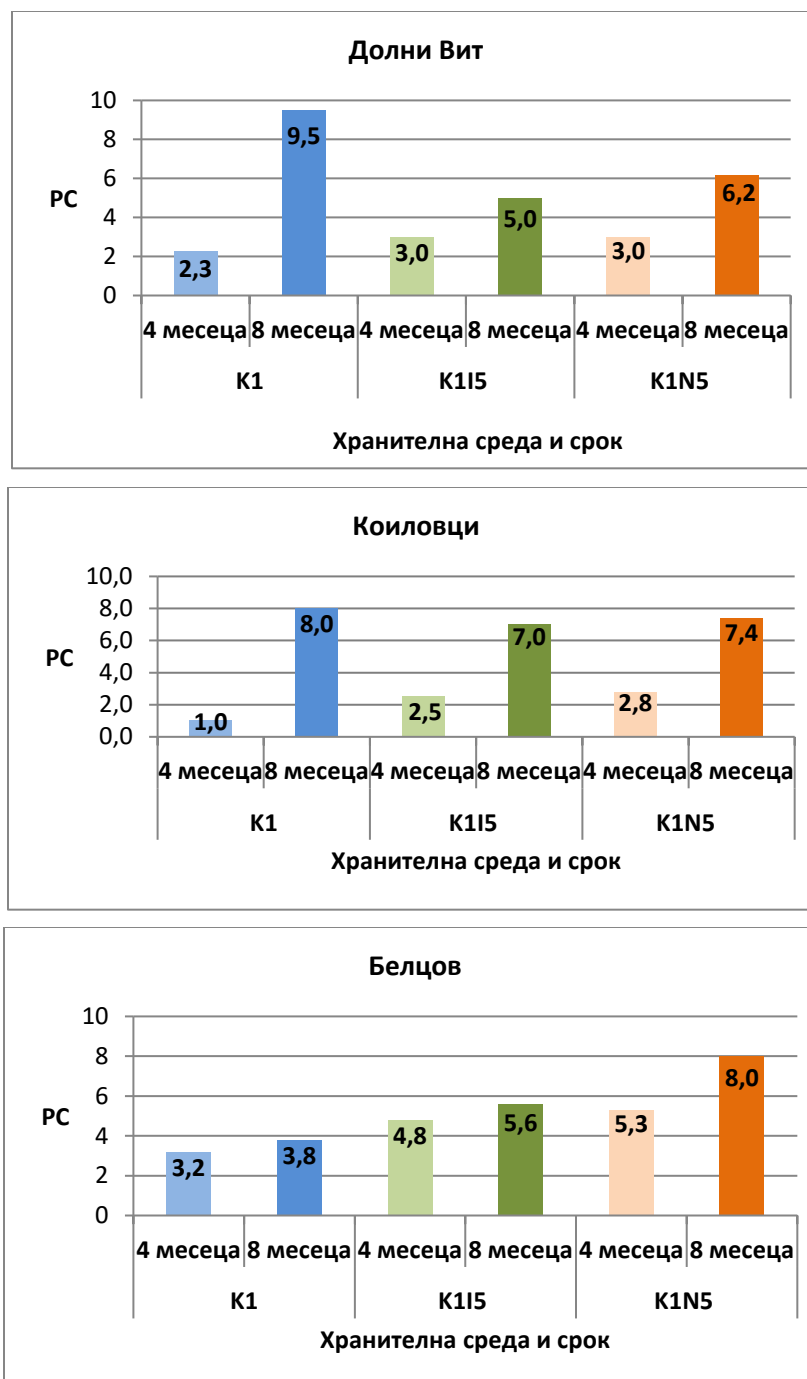
При сравняване на размножителния коефициент на *in vitro* културите с различен произход се установява, че той е най-висок на среда K1 за находището от Долни Вит, при Коиловци не се отбелязва съществена разлика на различните среди, докато при Белцов най-ефективна е среда K1N₅. Това дава индикация за връзката между произход и хранителна среда. Изборът на най-подходяща среда е направен не само на базата на количествените показатели (размножителен коефициент и регенерационна способност), а и във връзка с качествените показатели (образуване на калус, наличие на корени, големина на листата, поява на витрификация). При това е възможно най-подходящите среди за ускорено размножаване и за вкореняване да се различават по своя състав.

Според нашите резултати Kin е много по-подходящ цитокинин в сравнение с BAP. Сравнението на двете среди, различаващи се само по ауксина: K1I₅ и K1N₅, потвърждава

въздействието на ИВА върху вкореняването. Наличието на NAA, за разлика от това, възпрепятства развитието на корена.

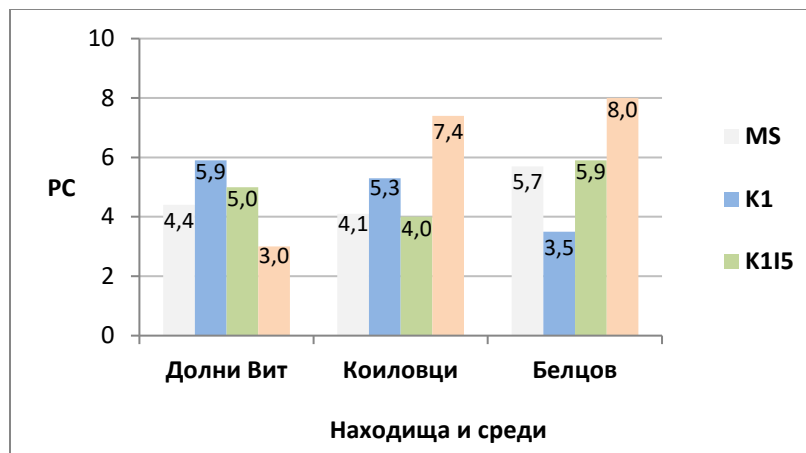


Фиг. 7. Развитие на стъблени експланти (междувъзлия от *in vitro* растения) върху среди с различен състав, след първото *in vitro* субкултивиране: **А)** Образуване на листа и калус върху среда K1; **Б)** размножаване на растителни издънки върху среда K1; **В)** Издънки на среда K1I₅; **Г)** Корени върху среда K1I₅ (поглед от дъното на контейнера); **Д)** Издънки на среда K1N₅; **Е)** Корени върху среда K1N₅ (поглед от дъното на съда).



Фиг. 8. Сравнение на размножителния коефициент на *in vitro* култури, растящи на 3 вида хранителни среди, с продължителност на култивирането 4 и 8 месеца, с произход: А) Долни Вит; Б) Коиловци; В) Белцов.

При третото субкултивиране, направено 4 месеца след второто, при всички произходи се наблюдава повишаване на размножителния коефициент, като се запазва връзката между находището и най-благоприятната среда при Долни Вит и Белцов (Фиг. 9).

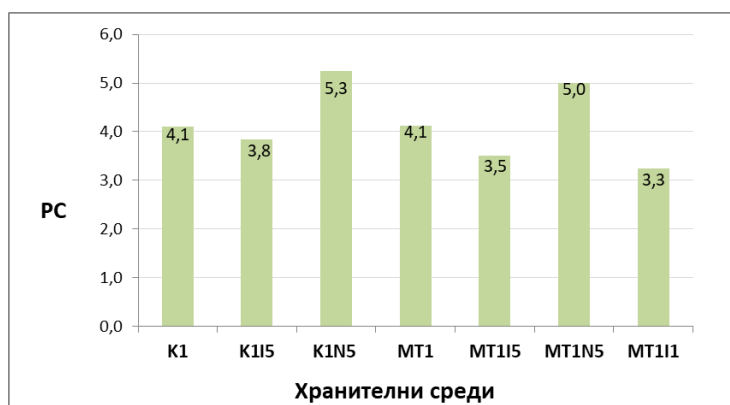


Фиг. 9. Сравнение на размножителния коефициент на третото субкултивиране, при трите произхода на различни среди.

Прави впечатление, че в *in vitro* условия се запазва биологичната особеност на вида, свързана с изсъхване на старите летораста при появата на нови на следващата година. Така, повишаването на РС не се основава на нови издънки в основата на стъблени експлант, а е свързано с по-бързия растеж и разклоняването на стъблото, при което от едно *in vitro* растение се получава по-голям брой нови експлант при следващото субкултивиране. За бързия растеж допринася и добавянето на активен въглен в средите, което стимулира коренообразуването.

При референтния произход от Украйна бяха изпитани и среди с цитокинина Мета-Тополин, самостоятелно (среда MT1 – 1 mg/l) или в комбинация със същите ауксини в същите концентрации както при средите с Kin (среда MT1I5 – 1 mg/l MT + 0.5 mg/l IBA и среда MT1N5 – 1 mg/l MT + 0.5 mg/l NAA), както и среда за вкореняване с преобладаване на ауксина: MT1I1 (0.1 mg/l MT + 1 mg/l IBA).

При нашите опити с *G. glabra* на среди, съдържащи Kin или MT в комбинация с едни и същи ауксини, не бяха отбелязани разлики в размножителния коефициент, дължащи се на тествания цитокинин (Фиг. 10). При всички среди, в които е включен ауксинът IBA, беше наблюдавано спонтанно вкореняване без образуване на калус, но поради голямата разлика в цената, кинетинът е за предпочитане.



Фиг. 10. Сравняване на размножителния коефициент на изпитаните хранителни среди при референтния произход Украйна.

Вземайки предвид ефективността на размножаване на издънки и качеството на получените *in vitro* растения, средата K1I5 с добавен активен въглен бе избрана като най-подходяща за размножаване на *G. glabra*. От поставянето на семената на основна среда MS до регенериране на цели вкоренени *in vitro* растения след първото субкултивиране, са необходими 6 месеца. С оглед получаване на по-голям брой растения е препоръчително да се извършат няколко последователни субкултивирания на среда K1I5 преди да се пристъпи към *ex vitro* адаптация на растенията.

5.5.3. Индуциране на калусови *in vitro* култури и опити за получаване на растения от тях

Калусовите култури са ценни поради възможността от тях да се регенерират *in vitro* растения чрез индиректна органогенеза или соматична ембриогенеза. Калусите, образувани на среди I1 и K1 върху коренови експлантите, са пихтиести, а този, образуван на среда K1N5 е твърд и ронлив. На среда I1, съдържаща 1 mg/l IBA като единствен растежен регулатор, калусите образуват тънки бели коренчета, но при нито една от изпитаните среди не се наблюдава образуване на издънки.

Допълнително бяха изпитани и среди K5T2D2 (съдържаща растежните регулатори Kin, TDZ и 2,4-D) както и MS60 (основна среда с удвоено количество захар, 60 g/l). Под влияние на ауксина 2,4-D всички видове експлантите, заложи на среда K5T2D2 – междувъзлия, стъблени дръжки и листа, образуваха бял рехав калус, но наличието на Kin и TDZ не доведе до индиректна органогенеза. На среда MS60 кореновите експлантите образуваха калус, който покафеня.

5.5.4. Опити за получаване на *hairy-root* коренова култура посредством щам на *Agrobacterium rhizogenes*

Успешно бе активирана бактерията *Agrobacterium rhizogenes* върху петрита с хранителна среда YEB и бе създадена бактериална суспензия с добра оптична плътност (0.6 – 0.8 измерена при 600 nm). Листа от *in vitro* растения бяха наранени, поставени в суспензията за 10 мин., подсушени върху стерилна филтърна хартия и кокултивирани с *A. rhizogenes* върху MS среда за 72 ч. на тъмно при 26 °C. Експлантите бяха пренесени на среда MS, съдържаща 350 mg/l антибиотик Терцеф за индуциране на *hairy-root* култура.

Въпреки неколнократните опити за индуцирането на генно трансформирана *hairy roots* а коренова култура по различни методики и с различен вид експлантите: листа, стъбла и корени, и калуси, не бе наблюдавана генетична трансформация. При един от опитите се получи калус, но не и *hairy-root*. Индуцирането на коренова култура от типа *hairy-root* бе неуспешно при условията, при които е рутинно при много други видове.

5.6. *Ex vitro* адаптация и аклиматизация

Етапът *ex vitro* адаптация е с ключово значение за успеха на метода *in vitro* размножаване. При голия сладник този етап се оказва много труден. Въпреки това, успешно бяха адаптирани и аклиматизирани на открито в *ex situ* колекцията *in vitro* получени растения от всички изпитани произходи. В една от популациите бяха засадени и няколко растения, размножени *in vitro* или от резници на столони.

5.6.1. *Ex vitro* адаптация

In vitro културите, от които бяха изнесени растения за *ex vitro* адаптация, бяха на възраст около 3 - 4 месеца за трите български произхода, а за референтния произход от Украйна – на 6 седмици, поради по-бързия растеж. Всички *in vitro* растения, определени за *ex vitro* адаптация, бяха с височина около 10 cm и с добре развита коренова система на среди MS, П1 или К1, на които бе наблюдавано спонтанно вкореняване.

За *ex vitro* адаптация, в климатичния шкаф бяха изнесени растения на няколко пъти, в интервала от януари 2017 до септември 2019, общо 185 броя от всички произходи (Табл. 4). Не бяха отбелязани различия, свързани със сезона на адаптация.

Табл. 4. *Ex vitro* адаптация на размножените *in vitro* растения от гол сладник.

Произход	Климатичен шкаф			Фитотрон		Оранжерия	
	Изнесени	Оцелели, бр.	%	Оцелели, бр.	%	Оцелели, бр.	%
Долни Вит	13	7	53.8	7	100.0	7	100.0
Коиловци	57	17	29.8	9	52.9	7	77.8
Белцов	5	5	100.0	4	80.0	4	100.0
Украйна	110	49	44.5	29	59.2	25	86.2
Общо	185	78	42.2	49	62.8	43	87.8

Ex vitro адаптацията към нестерилни условия и почва протече в 2 етапа:

При първия етап растенията бяха пренесени в климатичен шкаф със стриктен контрол на температурата, осветлението и въздушната влажност, за 6 до 8 седмици. Относителната въздушна влажност в началото бе 90% и постепенно бе намалявана до 65% в края на периода, а температурата и осветлението симулираха денонощните изменения в естествени условия.

Вторият етап на адаптация бе във фитотронно помещение с по-широка амплитуда на стойностите на тези три параметъра на околната среда и продължи няколко месеца. Поради по-бавния растеж на *in vitro* културите с произход Долни Вит и Белцов и невъзможността да бъде иницирана повторно култура от Белцов поради липсата на семена в находището в няколко последователни години, адаптацията при тези произходи бе осъществена еднократно, с малък брой растения.

Втората стъпка от *ex vitro* адаптацията бе по-успешна, при което във фитотронното помещение оцеляха 62.8% от растенията.

5.6.2. Аклиматизация

През март 2019 г. укрепналите във фитотрона растения бяха пренесени в неотопляема оранжерия за по-нататъшна аклиматизация.

Почти всички растения успешно се аклиматизираха в неотопляемата оранжерия: 87.8%.

Растенията в оранжерията са вече на 4-годишна възраст, с височина между 60 и 80 cm. Размерите им са ограничени от големината на саксиите.

По 2 растения от произходите Коиловци, Белцов и Украйна, са засадени на опитните площи на ИБЕИ-БАН за проследяване на развитието им и евентуални допълнителни изследвания.

Получените резултати доказват приложимостта на метода на *in vitro* микроразмножаване при *Glycyrrhiza glabra*, което би било от практическо значение при създаване на стопанско насаждение. Би могло да се работи в посока повишаване оцеляването на растенията при началната адаптация, която по принцип е най-рисков момент при много видове, напр. чрез оптимизиране на почвения субстрат.

5.6.3. Връщане на растения в известно находище

Освен за създаване на стопанско насаждение от гол сладник, размножените *in vitro* или чрез резници от столони растения биха могли да се използват за стабилизиране и разрастване на известните популации на вида. С тази цел, през септември 2017 г. в находището до с. Долни Вит при защитена местност “Червеният бряг“ са засадени 12 растения: 5 получени от резници от столони и 7 *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани растения, всичките размножени от изходен растителен материал взет от същото находище. Растенията бяха отбелязани с цел бъдещ мониторинг.

5.7. Създаване на *ex situ* колекция от гол сладник.

Създадена е и *ex situ* колекция с растения, получени от резници на столони от 3 български популации: Долни Вит, Коиловици и Белцов, събрани през 2016 г. Резниците от столони бяха засадени през есента на 2016 г. и още през първата пролет се появиха летораста. Растенията са използвани за целогодишни фенологични наблюдения, както и за сравнение на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в корените им при еднакви контролирани условия (почви и микроклимат).

Още през първия вегетационен период бяха отбелязани различия между индивидите, произхождащи от различните находища, като тези с произход Долни Вит образуваха най-голяма растителна маса и няколко летораста. Тази тенденция се запази и през следващите години. В природата, всяка година в края на есента леторастите изсъхват и през пролетта израстват нови. В условията на *ex situ* култивиране бе отбелязана същата закономерност, като всяка есен леторастите бяха отрязвани, а напролет се появяваха нови.

Още през втория вегетационен сезон растенията достигнаха зрялост. Някои летораста образуваха по 6-7 цветоноса, а през 2019 г. се образуваха и семена.

Наблюдавана бе тенденция към бързо разрастване на площта, заета от *G. glabra*, благодарение на образуването на подземни столони във всички посоки и израстване на летораста на няколко метра от първоначално засадените резници от столони. За да предпазим съседните видове в *ex situ* колекциите на ИБЕИ, разрастването на растенията е контролирано чрез редовно изрязване на леторастите, а също и на стOLONите.

Ex vitro адаптираните и аклиматизирани растения на опитните площи на ИБЕИ (засадени през април 2019 г.) се развиват нормално, като при произход Украйна бе отбелязан най-бърз растеж. Те представляват допълнителна *ex situ* колекция от *G. glabra*, получена от *in vitro* размножените растения. В сравнение с растенията, получени от

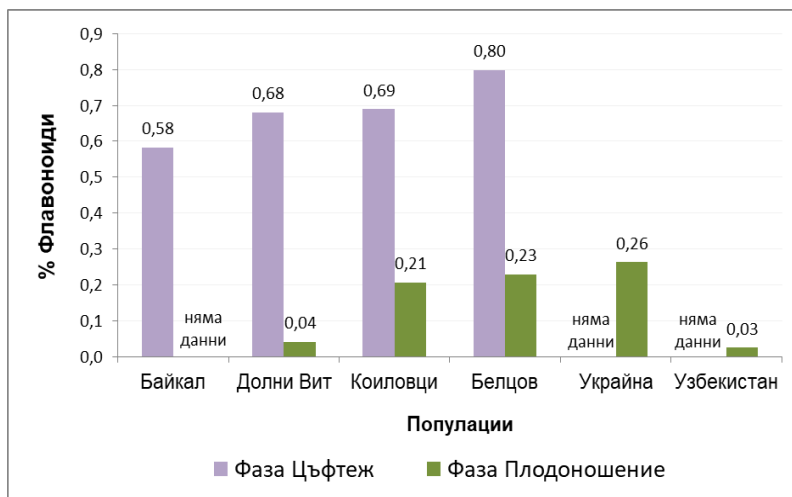
резници на столони, те нарастват по-бавно. При достигане на подходящи размери, корените им биха могли да бъдат изследвани за съдържание на глициризин и общи флавоноиди.

5.8. Фитохимични анализи на корени от *Glycyrrhiza glabra*

5.8.1. Анализ на общи флавоноиди в метанолови екстракти от корени

Направен бе сравнителен анализ на общите флавоноиди в метаноловите екстракти от корени, събрани от 4-те български популации на *G. glabra* през фазите плодоношение (октомври 2017) и цъфтеж (юни 2018), както и от двата референтни произхода във фаза плодоношение (2018 г.). Анализирани бяха и метанолови екстракти, получени от 3-годишни корени, събрани през септември 2020 г. от растенията в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, с произход от три български популации (Долни Вит, Коиловци и Белцов), получени от резници на столони и култивирани при контролирани условия (поливане, плевене, подрязване на сухите летораста).

Процентното съдържание на общи флавоноиди изразени като хиперозид, е много по-високо във фаза цъфтеж отколкото във фаза плодоношение (Фиг. 11 и Табл. 5-А). Няма статистически значима разлика между съдържанието им в българските популации във фаза цъфтеж. Във фаза плодоношение стойностите са сходни за Коиловци, Белцов и Украйна (над 0.2%), докато за Долни Вит и за Узбекистан са много по-ниски (под 0.04%) ($P < 0.001$) (Табл. 5-Б).



Фиг. 11. Съдържание на общи флавоноиди в корените на всички изследвани произходи женско биле по време на цъфтежа и на плодоношението.

Интерес представлява евентуалната връзка между факторите произход и фенофаза. За да бъде изследвана е необходимо да има данни за съдържанието на общи флавоноиди и през двете фенофази, поради което произходите Байкал, Украйна и Узбекистан са изключени от това сравнение. Популацията край с. Байкал бе потвърдена едва през пролетта на 2018, а от референтните произходи Украйна и Узбекистан разполагахме само с корени, взети през фаза плодоношение.

Табл. 5. Сходство и разлики в съдържанието на общите флавоноиди в корените на гол сладник от изследваните произходи:

- А) Сравнение на общите флавоноиди в българските популации по време на фаза цъфтеж;
 Б) Сравнение на общите флавоноиди във всички изследвани произходи по време на фаза плодonoшение.

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Байкал	3	1,7484	0,582785	0,009147		
Долни Вит	3	2,0437	0,681225	0,032846		
Коиловци	3	2,0705	0,69015	0,008094		
Белцов	3	2,3945	0,798178	0,017727		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,069779	3	0,02326	1,37199	0,319346	4,066181
Within Groups	0,135627	8	0,016953			
Total	0,205406	11				

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Долни Вит	4	0,164	0,040881	0,000733		
Коиловци	3	0,619	0,206248	0,002725		
Белцов	3	0,688	0,229187	0,005315		
Украйна	3	0,788	0,26259	0,002672		
Узбекистан	3	0,076	0,025191	3,87E-05		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,160413	4	0,040103	18,61349	7,34E-05	3,35669
Within Groups	0,0237	11	0,002155			
Total	0,184113	15				

От статистическия анализ, направен с ANOVA: Двухфакторен анализ с повторения е ясно, че съществуват достоверни разлики между стойностите на съдържанието на общите флавоноиди по време на цъфтежа и на плодonoшението (Табл. 6). Натрупването на флавоноиди през пролетта може да се обясни с важните им хемоекологични функции, свързани с адаптация на растенията към вредители и патогени и към различни неблагоприятни фактори на околната среда.

Табл. 6. Съдържание на общите флавоноиди в зависимост от популацията и фенологичната фаза (ANOVA: Двухфакторен анализ с повторения) – анализът обхваща само произходите, за които има изследвания и през двете фенофази.

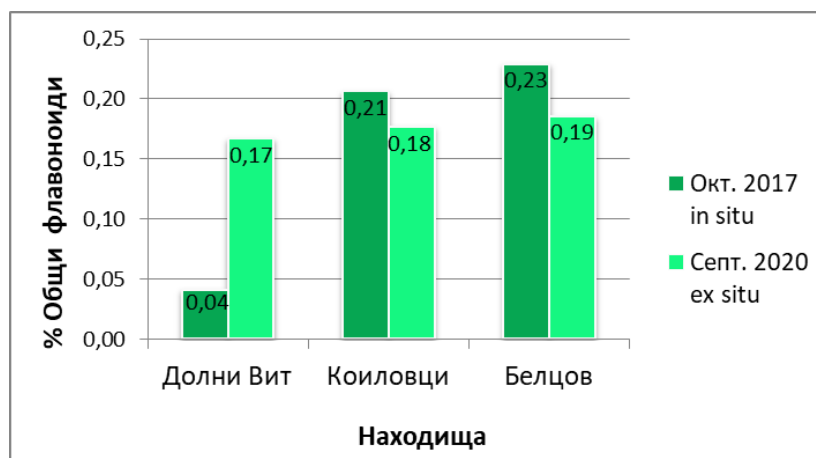
Anova: Two-Factor With Replication						
SUMMARY	Долни Вит	Коиловци	Белцов	Total		
Плодonoшение						
Count	3	3	3	9		
Sum	0,115035	0,618743	0,68756	1,421338		
Average	0,038345	0,20624767	0,2291867	0,157926		
Variance	0,001060292	0,00272545	0,005315	0,010417		
Цъфтеж						
Count	3	3	3	9		
Sum	2,043676395	2,07045125	2,3945334	6,508661		
Average	0,681225465	0,69015042	0,7981778	0,723185		
Variance	0,032846115	0,00809404	0,0177266	0,017845		
Total						
Count	6	6	6			
Sum	2,158711395	2,68919425	3,0820934			
Average	0,359785233	0,44819904	0,5136822			
Variance	0,13755115	0,07457636	0,1063419			
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	1,437825347	1	1,4378253	127,3023	9,58E-08	4,747225
Columns	0,07157868	2	0,0357893	3,168719	0,078534	3,885294
Interaction	0,01898679	2	0,0094934	0,840527	0,455376	3,885294
Within	0,135534908	12	0,0112946			
Total	1,663925726	17				

Разликите в стойностите на съдържанието на общите флавоноиди в изследваните три български популации, за които има данни през двете фенофази, са близки до статистически достоверните. Не е установена взаимозависимост между двата фактора.

Приложена бе и тънкослойната хроматография като метод за първичен скрининг на растителните метанолови екстракти за съдържащите се БАВ в тях. Установено бе, че екстрактите на пробите от фаза плодonoшение през 2016 г. са богати на флавоноидни агликонни, като едно съединение (агликон) беше определено само в пробата от Долни Вит. Флавоноидните профили, свързани с гликозидите, бяха еднакви в качествено и количествено отношение, поради което не са изследвани през следващите години. Профилите на флавоноидните агликонни показват по-голяма вариабилност главно по отношение на количеството, като при следващите изследвания не бяха установени различия между пробите от изследваните произходи.

5.8.1.2. Съдържание на общи флавоноиди в корени от *ex situ* колекцията на ИБЕИ

Общите флавоноиди в коренови проби от растения с произход от трите български популации, култивирани 3 години при еднакви условия в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, показват сходни стойности (Фиг. 12).



Фиг. 12. Съдържание на общите флавоноиди в проби от *ex situ* колекцията, с произход от трите български популации

Сравнителният анализ между пробите на изходните растения *in situ* (събрани от находищата през окт. 2017) и пробите от вегетативно размножените *ex situ* растения от столони на същите растения (извадени септ. 2020) показват сближаване на процента на общите флавоноиди. Разликата в съдържанието на флавоноидите в пробите *in situ* и *ex situ* при произход Долни Вит е значителна ($P < 0.001$, ANOVA single factor), докато при другите два произхода разликите не са достоверни (Табл. 7).

Тънкослойната хроматография от корени на растенията от *ex situ* колекцията, събрани през фаза плодonoшение (септ. 2020) показва сходни профили на флавоноидните агликонни при растенията с различен произход.

Табл. 7. Разлика в съдържанието на общи флавоноиди при произход Долни Вит.

Anova: Single Factor				
SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
in situ 2017	4	0,151	0,03775	0,000604
ex situ 2020	3	0,502	0,167333	0,000142

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,028786	1	0,028786	68,68804	0,000417	6,607891
Within Groups	0,002095	5	0,000419			
Total	0,030881	6				

5.8.2. Съдържание на глициризинова киселина в корени от гол сладник

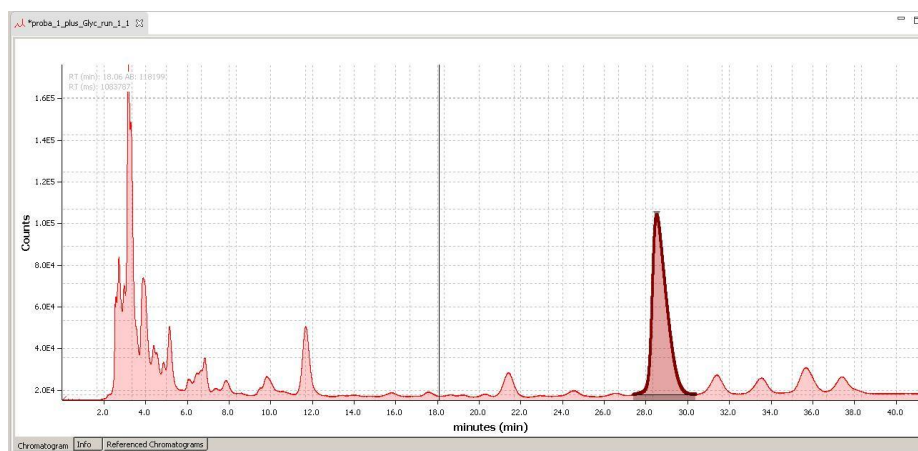
5.8.2.1 Съдържание на глициризинова киселина в корени от известните български находища

Във фаза плодonoшение четирите изпитани български популации на женско биле се различават значително според съдържанието на глициризин ($P < 0.001$), разпределени в 3 групи: Белцов; Долни Вит и Коиловци; Байкал (Табл. 8). Най-богата е популацията край с. Белцов ($29.6 \pm 2.3 \text{ mg/g DW}$), с ясно изразен пик на глициризина (Фиг. 13).

Табл. 8. Разлики в съдържанието на глициризин в четирите български популации, по време на плодonoшението.

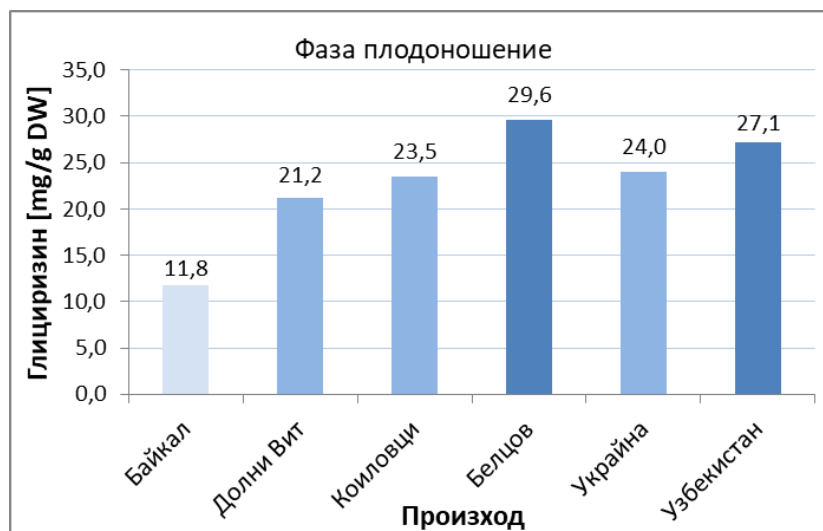
Anova: Single Factor				
SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
Байкал	3	35,25386	11,75129	0,287236
Долни Вит	3	63,53309	21,1777	1,271251
Коиловци	3	70,57446	23,52482	15,26316
Белцов	3	88,74556	29,58185	5,587661

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	493,6717	3	164,5572	29,37301	0,000114	4,066181
Within Groups	44,81862	8	5,602328			
Total	538,4903	11				



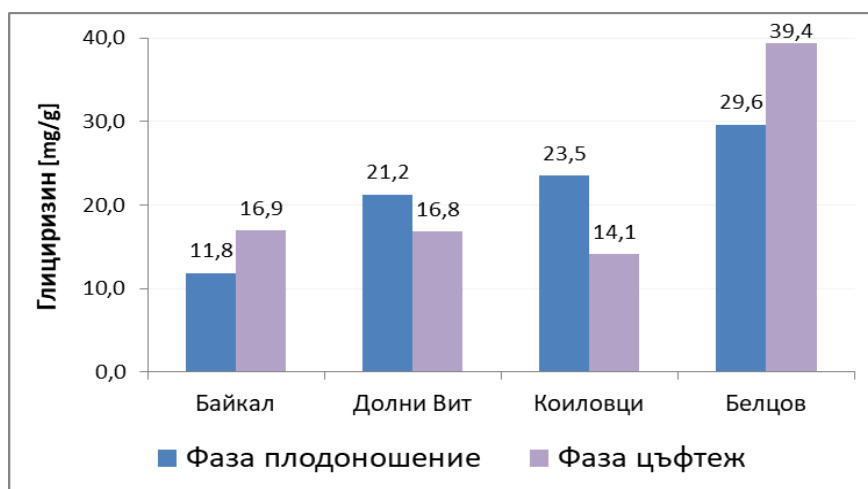
Фиг. 13. HPLC хроматограма на проба от популация Белцов във фаза плодonoшение.

Популацията при с. Белцов е със сходни стойности с тези на пробата с произход Узбекистан, най-бедна е популацията до с. Байкал (11.8 ± 0.5 mg/g DW), докато другите две популации са сходни с пробата с произход Украйна, с междинни стойности между 21.2 и 24.0 mg/g DW. (Фиг. 14).



Фиг. 14. Съдържание на глициризин в корените на всички изпитани популации във фаза плодonoшение.

Съдържанието на глициризинова киселина в корените на растения от четирите български популации беше изследвано през фазите плодonoшение (окт. 2017) и цъфтеж (юни 2018). Отбелязани бяха сезонни флукутации в съдържанието на глициризин в популациите (Фиг. 15). Анализът на двата изпитани фактора: произход и фенофаза, показва разлики с най-висока степен на достоверност между съдържанието на глициризин в популациите ($P < 0.001$), както и взаимодействие между факторите ($P < 0.001$, Anova: Two-Factor With Replication) (Табл. 9).



Фиг. 15. Съдържание на глициризин в корените на четирите български популации женско биле по време на цъфтежа и на плодonoшението.

Табл. 9. Разлики в съдържанието на глициризин в българските популации по време на цъфтежа и на плодоношението.

Anova: Two-Factor With Replication						
SUMMARY	Белцов	Байкал	Долни Вит	Коиловци	Total	
Цъфтеж						
Count	3	3	3	3	12	
Sum	118,2686	50,7805	50,43418	42,24042	261,7237	
Average	39,42288	16,92683	16,81139	14,08014	21,81031	
Variance	56,32096	3,111543	1,146257	1,4519	125,4953	
Плодоношение						
Count	3	3	3	3	12	
Sum	88,74556	35,25386	63,53309	70,57446	258,107	
Average	29,58185	11,75129	21,1777	23,52482	21,50891	
Variance	5,587661	0,287236	1,271251	15,26316	48,95366	
Total						
Count	6	6	6	6		
Sum	207,0142	86,03436	113,9673	112,8149		
Average	34,50237	14,33906	18,99454	18,80248		
Variance	53,8172	9,395394	6,686387	33,44662		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample (фенофаза)	0,545043	1	0,545043	0,051638	0,823115	4,493998
Columns (произход)	1402,756	3	467,5853	44,2999	5,64E-08	3,238872
Interaction	347,303	3	115,7677	10,96804	0,000369	3,238872
Within	168,88	16	10,555			
Total	1919,484	23				

Разликите между съдържанието на глициризин по време на цъфтежа и на плодоношението са статистически достоверни при три от популациите: Байкал, Долни Вит ($P < 0.01$) и Коиловци ($P < 0.02$), като само при популация Белцов разликите са близки до статистически значимите ($P = 0.096$), поради голямото вариране между стойностите на паралелните проби (Табл. 10).

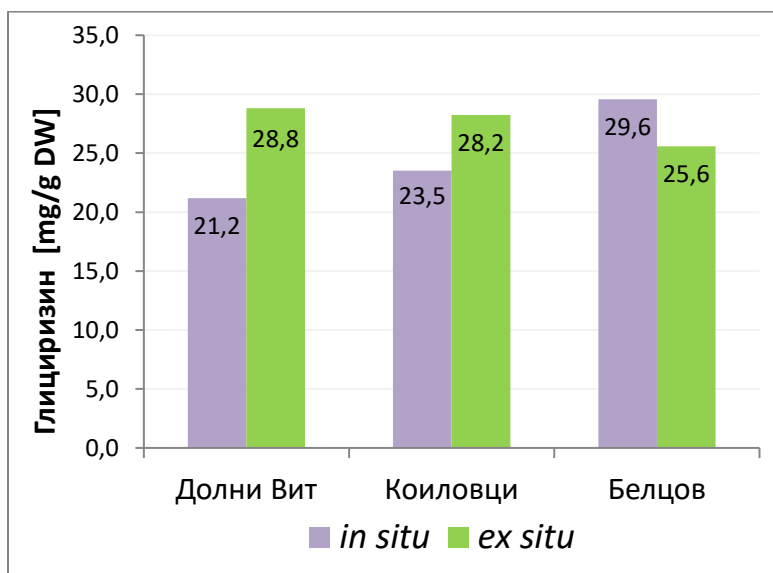
Табл. 10. Съдържание на глициризин в българските популации по време на фенофазите цъфтеж и плодоношение.

Популация	Цъфтеж		Плодоношение	
	Average	SD	Average	SD
Белцов	39.4	7.50	29.6	2.36
Байкал	16.9	1.76	11.8	0.54
Долни Вит	16.8	1.07	21.2	1.13
Коиловци	14.1	1.20	23.5	3.91

Взаимодействието между двата изследвани фактора се изразява в това, че съдържанието на глициризин в популациите Байкал и Белцов е по-високо по време на цъфтежа, докато в популациите Долни Вит и Коиловци то е по-високо по време на плодоношението.

5.8.2.2. Съдържание на глициризинова киселина в корени от *ex situ* колекцията на ИБЕИ

През октомври 2020 г. бяха събрани сегменти от столони от 3-годишните *ex situ* култивирани растения в опитните площи на ИБЕИ, с произход от трите български популации Долни Вит, Коиловци и Белцов. Възрастта на растенията е важна, тъй като само три или повече годишни корени са от търговско значение. Всички проби показваха подобни стойности на глициризин (Фиг. 16). Съдържанието на глициризин в култивираните растения с произход Белцов и Коиловци не се различава съществено от това на донорните растения от съответните популации. Единствено при произход Долни Вит съдържанието на глициризин в корените на култивираните растения е значително по-високо от това в корените, събрани от тази популация ($P < 0.01$, ANOVA single factor), като нараства от 21.2 на 28.8 mg/g сухо тегло.



Фиг. 16. Съдържание на глициризин в растения от 3-те популации, през есента: донорните диворастящи *in situ* – 2017 г. и култивираните *ex situ* – 2020 г.

Изследванията на съдържанието на глициризин при контролираните условия на *ex situ* колекцията са насочени към въвеждането на *Glycyrrhiza glabra* в агрокултура. Обикновено биосинтезата на вторични метаболити и натрупването им в растителните органи се влияят както от генотипа, така и от условията на околната среда. Счита се, че генетичният потенциал е от решаващо значение, поради което селекцията на високопродуктивни индивиди и тяхното размножаване са обичайни практики преди създаването на стопански насаждения. От друга страна, почвените характеристики (механичен и химичен състав) също са от важно значение, поради което съществува агроекологично райониране, основано главно на почвените и климатични характеристики в страната, свързано с основните изисквания на културите към почвата (хранителни вещества, физически и водни свойства, рН и др.).

От получените резултати за съдържанието на глициризин в растенията, култивирани при еднакви условия в продължение на 3 години в *ex situ* колекцията, възниква въпросът за генетичната принадлежност на растенията в изследваните находище.

Има сведения от местни жители, че женското биле е натурализиран вид в България в миналото, много по-широко разпространен покрай р. Дунав. Има вероятност всички находища, оцелели до наши дни, да принадлежат към една и съща популация. От друга страна, в *ex situ* колекцията, растенията с произход Долни Вит се отличиха с по-бърз растеж и образуване на много по-дълги столони и по-голям брой леторасти. За да се изясни въпросът с произхода на популациите е необходимо да се направят генетични изследвания които биха били от практическо значение при създаване на насаждения от женско биле. Необходимо е също да се проследи съдържанието на глициризин и общи флавоноиди във времето при контролираните условия на *ex situ* колекцията.

5.9. Почвени анализи

Според Танов (1956), находищата на *G. glabra* край селата Байкал, Долни Вит и Белцов попадат в зоната на разпространение на почви от клас Fluvisols (алувиални), а находището край село Коиловци попада в зоната на почви от клас Chernozems (черноземи). Имената на почвите са според Световната референтна база за почвени ресурси (WRB, 2014). Според други автори, почвата в находището до с. Белцов спада към карбонатни черноземи със слаб до умерен примес на пясък и отговаря на силно изветрена глинеста почва с рохкава, ронливо зърнеста структура (Stojanova & Grozeva, 1997).

При нашите наблюдения установихме, че почвата в находището при с. Долни Вит е пясъчлива, с ерозия на места, като по цвят и структура съществено се отличава от почвите в останалите находища. Както за находището при Долни Вит, така и за това при Белцов е характерна висока порьозност на почвата, което е свързано с добра водопроницаемост и не позволява натрупването на воден резерв по време на пролетни валежи (Stojanova & Grozeva, 1997).

Изследваните почви са от слабо кисели до много слабо алкални, със стойности на рН: Байкал 6.12, Коиловци 6.88, Белцов 7.38 и Долни Вит 7.51, като рН на почвата на опитното поле е с междинна стойност 6.76.

Физичните характеристики на пробите са представени на Табл. 11. Данните от анализа на химичния състав на почвените проби, взети от находищата и от *ex situ* колекцията (опитното поле), направен от Ник Агро сървис ООД, са представени на Табл. 12. Прави впечатление значително по-ниското съдържание на общ азот, усвоим калий и хумус в пробата от Долни Вит, в сравнение с всички останали почвени проби.

Табл. 11. Физични характеристики на почвените проби от находищата и *ex situ* колекцията.

Проба	Хигр. влага, %	Карбонати %	Размер на частиците в мм - %				
			2-0.2	0.2-0.02	0.02-0.002	<0.002	<0,01%
Байкал	3,88	10,94	8,20	60,80	17,80	13,20	23,90
Долни Вит	1,65	4,34	20,90	67,10	8,00	4,00	8,80
Коиловци	5,11	0,40	4,90	39,70	22,80	32,60	43,60
Белцов	4,28	9,02	4,20	45,10	24,10	26,60	38,60
Опитно поле	4,95	0,95	39,70	23,50	17,70	19,10	29,70

Табл. 12. Химични характеристики на почвените проби от находищата и *ex situ* колекцията.

Проба	Общ азот N %	Усвоим фосфор P ₂ O ₅ mg/kg	Усвоим калий K ₂ O mg/kg	Усвоим калций CaO mg/kg	Ник Агро*	Хумус %	Ник Агро*
Байкал	0,14	421,04	160,54	19829,87	В	2,94	С
Долни Вит	0,03	214,61	70,40	10371,46	В	1,71	Н
Коиловци	0,23	2460,98	269,28	7378,39	В	4,93	В
Белцов	0,20	1058,02	278,51	11024,85	В	3,37	Д
Опитно поле	0,15	165,42	156,64	5651,90	В	4,86	В

*Интерпретация на резултатите: МН-Много ниско; Н-Ниско; З-Задоволително; С-Средно; Д-Добро; В-Високо; МВ-Много Високо

Увеличеното съдържанието на глициризин при растенията с произход Долни Вит, култивирани 3 години в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, спрямо растенията в същото находище ($P < 0.01$), може да се обясни със съществените разлики в почвените характеристики на находището и на опитното поле: според известните класификации, единствено почвата от Долни Вит е с нисък запас на хумус (von Blume, 1995) и много слабо запасена с общ азот (Пенков, 1996).

При растенията от другите два произхода разликите в съдържанието на глициризин са статистически незначими, което може би е свързано със сходните стойности на хумус и на общ азот в почвата на опитното поле и на находищата край с. Коиловци и с. Белцов.

Според усвоимия калий почвите от находищата край с. Белцов и с. Коиловци се характеризират като много добре запасени, тази край с. Долни Вит – като средно запасена (Пенков, 1996), а почвата от опитното поле е с междинни стойности на усвоим калий. При продължителни периоди на засушаване, песъчливите почви с висока порьозност не могат да осигурят достатъчни количества наличен азот за поддържане на асимилацията на растенията. За разлика, при контролираните условия на *ex situ* колекцията, с прилагане на редовно поливане и плевене, бе отбелязан бърз растеж на растенията и развитие на многобройни столони и леторасти, особено при произход Долни Вит.

6. Заключение

В настоящия дисертационен труд е представено сравнително изследване на съдържанието на основните биологично-активни вещества в известните български находища на *Glycyrrhiza glabra*, направено със съвременни хроматографски методи. Всички сравнителни анализи на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди, направени през фазите цъфтеж и плодоношение, са оригинални. За по-голяма пълнота на проучването са включени и два референтни произхода с търговска стойност, от Украйна и Узбекистан.

Актуализирана е информацията относно броя на оцелелите български находища на *G. glabra*, известни по литературни данни в Дунавската равнина и е събран растителен

материал от четирите находища, намиращи се в защитените местности: ЗМ „Червеният бряг“ при с. Долни Вит, ЗМ „Палаза“ при с. Коиловци, ЗМ „Чешмата“ при с. Байкал (трите в Плевенска област) и ЗМ „Находище на обикновен сладник“ при с. Белцов (в Русенска област). През юни 2018 г., с помощта на РИОСВ-Плевен е потвърдено находището при с. Байкал, считано за изчезнало, поради което от него са събрани корени само през 2018 г., по време на двете проследени фази (цъфтеж и плодоношение) и не са събрани семена поради регистрирано косене на растенията.

Повечето резултати имат както научна, така и научно-приложна стойност и биха били от полза при бъдещо създаване на насаждение от гол сладник със стопанска цел. Това се отнася от една страна за създадения протокол за ускорено размножаване на вида с прилагане на биотехнологични методи, а от друга страна – за установените особености, свързани със съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в отделните находища и в адаптираните *ex situ* растения с различен произход.

По принцип е възприето схващането, че всички видове растения биха могли да бъдат размножени *in vitro*, въпреки че някои са по-податливи от други, наречени рекалцитранти. Често обаче се отбелязват видово специфични изисквания, а в научната литература се откриват съобщения с противоречиви данни, напр. по отношение въздействието на растежните регулатори върху растежа и развитието на експлантите, ефекта на броя субкултивирания върху ефективността на *in vitro* размножаването и др., поради което се налага експериментално определяне на подходящите изходни експлантите, хранителни среди, методи и условия на околната среда. Известно е също, че при сем. Fabaceae покълването на семената може да бъде стимулирано чрез последователно третиране с ледена и вряща вода, но няма данни, че покоят на семената е комбиниран физичен и физиологичен. Създаденият протокол за *in vitro* размножаване на гол сладник е цялостен, включващ и последната стъпка: аклиматизация на открито, която не е предвидена за краткия срок на докторанурата поради необходимото технологично време, но осъществяването ѝ бе възможно благодарение на удължения срок на научната разработка.

За да бъде селектиран най-подходящият изходен растителен материал, не е достатъчно да се определи популацията с най-високо съдържание на глициризин и общи флавоноиди, а е необходимо да се проследи и съдържанието им в адаптираните растения при контролираните условия на култивиране. Това е свързано с факта, че при *in vitro* размножаване на лечебни растения обикновено съдържанието на биологично-активни вещества спада в *in vitro* културите, но след *ex vitro* адаптация и аклиматизация на регенерираните растения, то е съизмеримо с това на изходните растения. Обикновено генетичната наследственост е с решаващо значение както за ефективността на *in vitro* размножаването, така и за биосинтезата на вторични метаболити, но характеристиките на почвата и микроклиматът също могат да оказват съществено влияние в рамките на генетичните заложи на донорните растения. Включените допълнително почвени анализи са свързани с интересните различия в съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в растенията с произход Долни Вит, развиващи се в условия *in situ* и *ex situ*. Трябва обаче да се вземе предвид, че растенията с търговско значение са минимум 3-годишни поради времето, необходимо за нарастване на корените и натрупване на вторичните метаболити в

тях, което доста надхвърля срока на една докторантура. Благодарение на създадените *ex situ* колекции от гол сладник, с произход от известните български находища, размножен *in vitro* или вегетативно от резници на столони, в следващите години могат да бъдат направени допълнителни изследвания в тази насока.

6.1. Изводи

В резултат на направените изследвания във връзка с темата на дисертационния труд, стигнахме до следните изводи:

А) Във връзка с размножаването на голия сладник с биотехнологични методи и опазването на вида:

- Установени са известни разлики между известните български популации, по отношение на плодородието. При популацията край с. Коиловци сравнително малък брой индивиди образуват бобове, предимно в периферията на популацията; в тази край с. Долни Вит много растения образуват бобове, както по периферията, така и във вътрешността на популацията; в популацията до с. Белцов в 3 от 4 години липсваха бобове, което вероятно се дължи на измръзване на цветовете в няколко последователни години поради необичайно студената пролет.
- Съхранението на семената при стайна температура в продължение на 6 месеца преди въвеждането им в *in vitro* култура има благоприятно влияние, като съществено се намалява микробиалното замърсяване (от 27% на 73% оцелели при произход Долни Вит), а се повишава кълняемостта
- Покоят на семената е комбиниран: физичен и физиологичен (PY + PD според общоприетата класификация). Физиологичният покой е преодолян благодарение на съхранението на семената при стайна температура за няколко месеца, а физичният покой е преодолян в условия *in vitro* чрез 10-кратно последователно потапяне в ледена и вряла вода за 5 сек. Кълняемостта е няколко пъти по-висока когато третирането се приложи след 6-месечно съхранение на семената в сравнение с прилагането му веднага след събирането им (съответно 11% и до 78% при един и същ произход). Стимулирането с растежни регулатори (GA₃ и Kin) и стратификацията с ниски температури (2 месеца при 10±5 °C) са неефективни.
- Стратификацията чрез многократно последователно потапяне на семената в ледена и вряла вода е много по-ефективна при условия *in vitro* отколкото *in vivo* (съответно 66.0% и 13.3% покълнали, при произход Белцов).
- Енергията на кълняемост в условия *in vitro* варира между 20 и 37% при различните произходи, като най-много семена покълват през първата седмица, а периодът на покълване продължава 3 седмици при произход Долни Вит и 5 седмици при останалите произходи.
- Жизнеността на семената от трите изследвани български популации е сходна: 40% при Белцов, 46% при Коиловци и 48% при Долни Вит.

- *G. glabra* е бавно растящ вид в условия *in vitro*, трудно податлив на култивиране. Растежът на културите е неравномерен дори при еднакъв произход и еднакъв състав на хранителната среда.
- Растежът и развитието на *in vitro* растенията се повлияват от добавените в средите растежни регулатори. От изпитаните цитокинини, Kin е най-подходящ (BAP предизвиква некроза, а MT е много скъп). От изпитаните ауксини подходящ е IBA (стимулира коренообразуването, докато NAA води до образуване на калус, а в някои случаи и до витрификация).
- Най-ефективната техника за *in vitro* ускорено размножаване на гол сладник е директната регенерация, а най-добрата среда за нея е K1I5, съдържаща 1 Kin, mg/L, 0.5 mg/L IBA и 1 mg/L активен въглен, на основа MS. Тя е избрана въз основа на качествени и количествени показатели: морфологични признаци на растенията (разклоняване на стъблото, брой и цвят на листата, наличие на корени и/или калус, развитие на корените) и размножителен коефициент на културите (брой нови издънки на експлант, брой междувъзлия на стъбло).
- Установени са известни различия между изпитаните произходи по отношение на размножителния коефициент, развитието на *in vitro* корените и броя на листата, на една и съща среда. На основна MS среда най-добре се развиват културите с произход Белцов (PC 5.7±1.4 за 4 месеца). На средите с добавени растежни регулатори, тяхната ефективност е по-висока през първите месеци на култивиране, докато културите с произход Долни Вит и Коиловци се нуждаят от двойно повече време за постигане на висок размножителен коефициент, откъдето и оптималният период на субкултивиране е различен
- Най-подходящи експлантанти за калусообразуване са вторични експлантанти от листа и корени на *in vitro* получени растения, на среда MS с 60 g/L захар. Растежът на калуса е бавен, а индиректната органогенеза е затруднена.
- Най-ефективен метод за *in vitro* култивиране на гол сладник е клоналното микроразмножаване чрез субкултивиране на стъблото и разклоненията му и използването на междувъзлията като вторични експлантанти. При следващото субкултивиране на същите среди размножаването се ускорява при всички произходи, като за 4 месеца се постига ефективност на размножаване сравнима с тази за 8 месеца при предходното субкултивиране, за което способства и добавянето на 1 mg/L активен въглен в средата (стимулиращ коренообразуването).
- Установено е, че в *in vitro* условия се запазва биологичната особеност на вида, свързана с изсъхване на старите летораста при появата на нови на следващата година. В тази връзка, повишаването на ефективността на размножаване е свързана с растежа и разклоняването на стъблото, от което се изрязват нови експлантанти, а не с образуване на множество издънки в основата на стъблени експлант.
- Индуцирането на коренова култура от типа *hairy-root* с изпитване на два различни щама *Agrobacterium rhizogenes* е неуспешно при условията, при които е рутинно при много други видове.

- Първата стъпка от *ex vitro* адаптацията е най-трудна, въпреки стриктните условия, поддържани в климатичния шкаф (42.2% оцелели от 185 растения, подложени на адаптация). При всяка следваща стъпка процентът на успешно развиващите се растения нараства (62.8% във фитотронното помещение и 87.8% в неотопляемата оранжерия). От засадените на открито в опитните площи на ИБЕИ 6 растения през 2019 г., 5 се развиват нормално, като при произход Украйна е отбелязан най-бърз растеж и образуване на много столони и леторасти.
- Срокът, необходим за получаване на растения от *G. glabra* по метода *in vitro* микроразмножаване, готови за засаждане на открито, е около година: 6 месеца за регенериране на *in vitro* растения с корени и по 2 месеца за постепенна *ex vitro* адаптация в климатичен шкаф, фитотронно помещение и оранжерия..
- При растенията, размножени вегетативно чрез резници от столони и култивирани при контролираните условия на *ex situ* колекцията (редовно поливане и плевене), е отбелязан бърз растеж и развитие на многобройни столони и леторасти около първоначално размножените растения, особено при произход Долни Вит.
- Растенията, получени от резници на подземни столони и използвани за създаване на *ex situ* колекция на открито нарастват по-бързо в сравнение с *in vitro* размножените и *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани при същите условия в опитните площи на ИБЕИ.

Б) Във връзка с фитохимичния анализ на основните биологично-активни вещества

- Растенията от четирите изпитани български популации на женско биле се различават значително по съдържание на глициризин ($P < 0.001$). Най-богатата на глициризин българска популация на гол сладник е тази край с. Белцов (29.6 ± 2.3 mg/g DW по време на плодоношението и 39.4 ± 7.5 mg/g DW във фаза цъфтеж), сравнима с референтния произход от Узбекистан и по-богата от референтния произход от Украйна (двата с търговско значение).
- Отбелязани са сезонни флуктуации в съдържанието на глициризин в четирите изпитани български популации като разликите по време на цъфтежа и на плодоношението са статистически достоверни при три от популациите: Байкал, Долни Вит ($P < 0.01$) и Коиловци ($P < 0.02$) и близки до статистически значимите при популация Белцов ($P = 0.096$). Установено е взаимодействие на факторите произход и фенофаза по отношение съдържанието на глициризин ($P < 0.001$).
- Съдържанието на глициризин в корени на вегетативно размножените растения от резници на столони с произход Белцов и Коиловци, култивирани 3 години при еднакви условия в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, не се различава съществено от това на донорните растения от съответните популации. Единствено при произход Долни Вит съдържанието на глициризин в корените на *ex situ* култивираните растения е значително по-високо от това в корените на донорното растение ($P < 0.01$), като се изравнява със съдържанието на глициризин в *ex situ* култивираните растения от другите два произхода. И при трите произхода съдържанието на глициризин

отговаря на изискванията на Японската фармакопея за минимум 2.5% в сухата маса.

- Съдържанието на общи флавоноиди в корените на растенията от българските популации Долни Вит, Коиловци и Белцов е много по-високо във фаза цъфтеж отколкото във фаза плодonoшение ($P < 0.001$). Стойностите на общите флавоноиди са сходни в четирите български популации по време на цъфтежа. Във фаза плодonoшение съществуват значителни различия ($P < 0.001$) – високо съдържание над 0.2% при произходи Коиловци и Белцов, а също и в референтния произход Украйна и много по-ниско, под 0.04%, при произход Долни Вит, както и в референтния произход Узбекистан.
- Общите флавоноиди в корени на вегетативно размножени растения от резници на столони с произход от 3 български популации, култивирани 3 години при еднакви условия в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, показват сходни стойности. Сравнителният анализ между тях и изходните растения *in situ* през фаза плодonoшение показват сближаване на процента на общите флавоноиди, като при произход Долни Вит се наблюдава значително повишаване на съдържанието им при *ex situ* култивиране ($P < 0.001$), докато при произходи Коиловци и Белцов се наблюдава слаба тенденция към понижаване на съдържанието им.
- Метаноловите екстракти от корени на женско биле са по-богати на флавоноидни агликонни, отколкото на гликозиди. Профилите на общите флавоноиди в четирите известни български популации са сходни по отношение на гликозидите, а флавоноидните агликонни показват по-голяма вариабилност, като един агликон е определен само в пробата от Долни Вит през фаза плодonoшение на 2016 г.
- Анализът на почвените проби от четирите известни български находища и от *ex situ* колекцията в ИБЕИ показва съществени разлики във физичните и химичните характеристики на пробата от Долни Вит в сравнение с всички останали проби: по-ниска хигроскопична влага и преобладаване на по-големите почвени частици; по-ниско съдържание на общ азот, хумус и усвоим калий. Това би могло да обясни значителното повишаване на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в *ex situ* култивираните растения с произход Долни Вит в сравнение с донорните растения от находището и изравняване на стойностите им с тези при *ex situ* култивираните растения с произход Белцов и Коиловци.
- За да се избере най-перспективен произход, подходящ за изходен материал при бъдещо създаване на насаждение от гол сладник, е необходимо няколкогодишно проследяване на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в растенията, култивирани в *ex situ* колекцията, поради възможни годишни флукуации. Необходимо е да се изследва съдържанието на глициризин и общи флавоноиди и в *in vitro* размножените и аклиматизирани растения в *ex situ* колекцията, след достигане на подходяща възраст.
- За избор на най-подходящ изходен растителен материал при създаване на насаждение от гол сладник е необходимо да се изясни относителното влияние на произхода на растенията и на почвените характеристики върху натрупването на

глициризин и общи флавоноиди в корените. За целта са необходими както генетични изследвания за изясняване на произхода на българските популации от гол сладник, така и култивиране на растения с еднакъв генотип върху почви от различен тип.

7. Приноси

А) Във връзка с размножаването на голия сладник с биотехнологични методи и опазването на вида:

- За първи път са направени сравнителни изследвания на известните български популации по отношение на възможността за размножаване на *G. glabra* с използване на биотехнологични методи: кълняемост на семената, ефективност на *in vitro* размножаването, *ex vitro* адаптация и аклиматизация на открито. В допълнение е направено и сравнение с референтен произход с търговско значение от Украйна.
- За първи път е направено сравнително изследване на жизнеността на семената с произход от известните български находища на *G. glabra*.
- Създаден е ефективен протокол за *in vitro* микроразмножаване на гол сладник. Установено е, че семената имат комбиниран физичен и физиологичен покой (PY + PD) и експериментално са определени подходящи условия за преодоляването му. Избрана е подходяща хранителна среда за клонално *in vitro* размножаване на *G. glabra*, която осигурява едновременно висок размножителен коефициент и ризогенеза, като се съкращава стъпката *in vitro* вкореняване в използвания метод.
- Създадени са две *ex situ* колекции в опитните площи на ИБЕИ: от растения, получени от резници от столони от 3 български популации на *G. glabra*: Долни Вит, Коиловци и Белцов, както и от *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани растения с произход Коиловци, Белцов и Украйна.
- Потвърдено е находището на *G. glabra* до с. Байкал, считано за изчезнало (намерено в двора на помпената станция).
- Петстотин семена от гол сладник с произход находището в ЗМ „Палаза“ до с. Коиловци са предадени за съхранение в Националната семенна банка в гр. Садово, с което е изпълнена една от препоръките за опазване на вида, формулирани в Червена книга на Република България.
- В находището до с. Долни Вит при защитена местност “Червеният бряг“ са засадени 12 растения: 5 получени от резници от столони и 7 *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани растения, всичките размножени от изходен растителен материал взет от същото находище.

Б) Във връзка с фитохимичния анализ на основните биологично-активни вещества:

- Данните за съдържанието на глициризин в известните български популации са актуализирани благодарение на по-съвършени съвременни хроматографски методи (HPLC).

- Потвърдено е, че най-богатата на глициризин българска популация на гол сладник е тази край с. Белцов.
- За първи път са направени сравнителни изследвания на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди *in situ* в корени от четирите известни български находища на *G. glabra*, във фазите цъфтеж и плодоношение и са установени статистически достоверни разлики между тях. Тези резултати потвърждават сезонните флуктуации в съдържанието на глициризин и общи флавоноиди при култивиране на гол сладник с чужд произход в полски условия. В допълнение е направено и сравнение с референтните произходи с търговско значение от Украйна и Узбекистан във фаза плодоношение.
- Установено е взаимодействие на факторите произход и фенофаза по отношение както на съдържанието на глициризин, така и на това на общи флавоноиди при растенията, развиващи се в природни условия в находищата ($P < 0.001$).
- Установено е, че съдържанието на глициризин и на общи флавоноиди в растенията, размножени вегетативно от резници на столови с различен произход (Долни Вит, Коиловци и Белцов), се изравнява след 3-годишно култивиране в контролираните условия на *ex situ* колекцията на ИБЕИ. Това се дължи на значителното повишаване на съдържанието им в *ex situ* условия при растенията с произход Долни Вит спрямо това в условия *in situ* ($P < 0.01$ за глициризина и $P < 0.001$ за общите флавоноиди).

Публикации по темата на дисертационния труд

1. **Kozhuharova A.**, Stanilova M. **2017**. *In vitro* cultures initiation from seeds of Bulgarian localities of *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), Journal of BioScience and Biotechnology, online SE, 25-30.
2. **Kozhuharova A.**, Stanilova M., Nikolova M. **2018**. Comparative analyses of flavonoids in roots of three Bulgarian and one Ukrainian *Glycyrrhiza glabra* L. Populations. Proc. of Seminar of ecology-2017 with international participation, 39-44.
3. **Kozhuharova A.**, Stanilova M., Nikolova M., Denev S, Berkov S. **2021**. Glycyrrizin and flavonoid contents of the Bulgarian *Glycyrrhiza glabra* population. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 74, 7, SJR (Scopus):0.205, JCR-IF (Web of Science):0.321

Участия в научни форуми с резултати по темата на дисертационния труд

1. "Първа Национална конференция за докторанти 2016" 1 Ноември 2016 година в град Пловдив.
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Stanilova M.
In vitro cultures initiation from seeds of Bulgarian localities of *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae).
2. Международна конференция „Иновативно образование по науки“ на 7 и 8 октомври 2016 г. в град Верона, Италия по проект „Работа в екип, Обучения и Технологии (TTTNET)“.
 - Кратко съобщение на тема: “*Glycyrrhiza glabra* L. – a suitable plant species for *in vitro* propagation”.
3. Семинар по екология, 27–28.04.2017г., София.
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Stanilova M., Nikolova M.
Comparative analyses of flavonoids in roots of three Bulgarian and one Ukrainian *Glycyrrhiza glabra* L. Populations.
4. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries 20–24.05.2018г. в гр. Сплит, Хърватия.
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Stanilova M., Nikolova M., Berkov S.
Glycyrrhizin Content in the Roots of *Glycyrrhiza glabra* L. from Bulgarian Populations.

5. 7th Balkan Botanical Congress от 10–14.09.2018г. в Нови Сад, Сърбия.
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Stanilova M., Nikolova M., Berkov S., Denev R.
Comparison of the Bulgarian *Licorice* populations by their glycyrrhizin and flavonoid contents and *in vitro* propagation rate.

6. 100 years Higher Agricultural Education in Bulgaria от 27–28.05.2021г., Стара Загора.
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Denev R., Berkov S., Stanilova M.,
Glycyrrhizin content in wild-growing and cultivated *Glycyrrhiza glabra* plants originating from Bulgarian populations.

7. International Seminar of Ecology, 28-29 September 2023, Sofia, Bulgaria
 - Участие с постер: **Kozhuharova A.**, Nikolova M., Berkov S., Stoyanov S., Yankova-Tsvetkova E., Plinkin V., Stanilova M.
Establishment of an *ex situ* collection of *Glycyrrhiza glabra* L. as a prerequisite for filed cultivation in Bulgaria

Осъществена е и кратка мобилност (в периода от 23 до 29 септември 2018 г.) в Института по биология на Румънската академия, в Букурещ, по покана на д-р Ирина Холобюк, за запознаване с работата на колегите, работещи в областта на клетъчна биология и растителни биотехнологии. Усвоих знания и опит, свързани със соматичната ембриогенеза и изкуствени семена от различни растителни видове.

Biotechnological approach for conservation and cultivation of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), Fabaceae

Asya Pavlova Kozhuharova

PhD thesis (130 p. incl. 16 tables, 48 figures, and 204 references), Sofia, 2023

Summary

Glycyrrhiza glabra L. (Licorice) is a perennial plant species from the family Fabaceae used in both traditional and official medicine for treatment of many diseases, among them cough, chronic hepatitis, ulcers, psoriasis, and as sweetener of many drugs. Its healing properties are due to the roots (Radix Glycyrrhizae) of 3-year or older plants. Licorice is distributed in South and East Europe and South-West Asia, and it is naturalized in some places in South-West Europe. In Bulgaria the area of *G. glabra* localities has decreased significantly due to their overexploitation in the past. The species has been assessed and categorized as “endangered” in the Red List of Vascular Plants in Bulgaria, it is under strict protection by the Biodiversity Act (2002), and was included in the Red Data Book of Bulgaria (2015).

The objective of the present PhD thesis was the experimental determination of the appropriate conditions for effective *in vitro* cultivation and *ex vitro* adaptation of *G. glabra* and analysis of its main biologically active substances: glycyrrhizin and total flavonoids, in the wild-growing plants from the Bulgarian populations and in 3-year-old *ex situ* cultivated plants originating from the wild ones.

The recent survey together with the regional authorities of the Ministry of environment and waters (MEW) confirmed the existence of only 3 licorice populations, situated in protected areas near to the villages Dolni Vit and Koilovtsi (Pleven district) and Beltsov (Russe district). In 2018, the locality of *G. glabra* near the village of Baikal, considered extinct, was also confirmed. The plant material for research was collected from all the localities in limited quantities with a special permission of MEW. *In vitro* cultures were initiated from seeds; stolon cuttings were used for vegetative reproduction of plants and establishment of an *ex situ* collection at the field plot of IBER, while root segments were used for phytochemical analyses. In addition, root segments originating from commercial plantations in Ukraine and Uzbekistan were used as referent samples for comparative analyses.

The seed viability of the three studied Bulgarian populations was similar: 40% for Beltsov, 46% for Koilovtsi and 48% for Dolni Vit. Seed dormancy was found to be combined: physical and physiological (PY + PD). Physiological dormancy was overcome by storing seeds at room temperature for several months, and physical dormancy was overcome by 10 times successive immersion in ice and boiling water for 5 s. with stratification being much more efficient under *in vitro* than *in vivo* conditions (66.0% and 13.3% germinated seeds, respectively, for Beltsov origin).

G. glabra is a slow-growing species *in vitro*. It was established that the biological feature of the species, related to the drying of the old shoots when new ones appear the following year, is preserved in *in vitro* conditions. In this regard, the most effective method for its cultivation was clonal micropropagation by sub-culturing the *in vitro* plant stem and its branches and using the internodes as secondary explants. The most suitable of the nutrient media tested, selected on the base of qualitative and quantitative indicators (stem branching, rooting, presence of callus,

number of new shoots per explant, etc.) was MS agar-solidified medium containing 1 mg/l active charcoal and supplemented with 1 mg/l Kin and 0.5 mg/l IBA (between 4 and 6 shoots per explant over a period of 4 months for the different origins).

In vitro obtained licorice plants were successfully *ex vitro* adapted first in a growth chamber (42.2% survival from 185 plants), then in a room phytotron (62.8% survival), and acclimated in an unheated greenhouse rates (87.8% survival). Plants transferred to the experimental field plot are growing forming underground stolons and new shoots.

In 2017, an *ex situ* collection of licorice has been created at the experimental field plot consisting of plants propagated from stolon cuttings originating from 3 Bulgarian populations of the species: Dolni Vit, Koilovtsi and Beltsov. Rapid growth and development of numerous stolons and shoots around the initially propagated plants was noted, especially for Dolni Vit origin where the shoots appear at a distance of more than 5 m from the first plant.

Data on glycyrrhizin content in known Bulgarian populations have been updated thanks to modern chromatographic methods (HPLC). The wild-growing plants from the four Bulgarian localities of licorice differed significantly in glycyrrhizin content ($P < 0.001$). The richest Bulgarian population in glycyrrhizin is the one near Beltsov village (29.6 ± 2.3 mg/g DW during fruiting and 39.4 ± 7.5 mg/g DW in the flowering phase), which is comparable to the reference origin from Uzbekistan and richer than the one from Ukraine (both with commercial importance). The content of total flavonoids was similar in the four Bulgarian populations during flowering, while in the fruiting phase there were significant differences ($P < 0.001$). An interaction of the factors origin and phenophase was found for both glycyrrhizin and total flavonoid content in plants growing in the wild localities ($P < 0.001$).

It was established that the content of glycyrrhizin and total flavonoids in plants propagated vegetatively from cuttings of stolons of different origins (Dolni Vit, Koilovtsi and Beltsov) leveled off after 3 years of cultivation in the controlled conditions of the IBER *ex situ* collection. This is due to the significant increase in their content under *ex situ* conditions in plants of Dolni Vit origin compared to that under *in situ* conditions ($P < 0.01$). The analysis of soil samples from the four Bulgarian localities and from the field plot showed significant differences in the physical and chemical characteristics of the sample from Dolni Vit compared to all other samples: predominance of larger soil particles; lower content of total nitrogen, humus and absorbable potassium, etc. This could explain the significant increase in the content of glycyrrhizin and total flavonoids in the *ex situ* cultivated plants originating from Dolni Vit compared to the donor plants from the site and the leveling of their values with those in the *ex situ* cultivated plants from Beltsov and Koilovtsi. In all three origins the glycyrrhizin content meets the requirements of the Japanese Pharmacopoeia for a minimum of 2.5% in the dry mass. In order to select the most appropriate starting plant material when establishing a licorice plantation, it is necessary to clarify the relative influence of plant origin and soil characteristics on the accumulation of glycyrrhizin and total flavonoids in roots. For this purpose, both genetic researches on the Bulgarian licorice populations and cultivation of plants with the same genotype on soils of different types are necessary.