



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ
ОТДЕЛ РАСТИТЕЛНО И ГЪБНО РАЗНООБРАЗИЕ И РЕСУРСИ

агроном Борянка Димитрова Трайкова

**Хидропонните технологии като средство за опазване и култивиране
на лечебни и консервационно значими растителни видове**

АВТОРЕФЕРАТ

на

Дисертация за придобиване на образователна и научна степен

„Доктор“

Научно направление: 4.3. „Биологически науки“

Научна специалност: 01.06.03 „Ботаника“

Научен ръководител: проф. д-р Марина Станилова

Научен консултант: доц. д-р Ина Анева

София

2024

Дисертационният труд се състои от 178 страници и включва 42 фигури, 17 таблици, 138 цитирани литературни източници.

Дисертацията е обсъждана 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 № /20.09.2024).

Защитата на дисертационният труд ще се състои на от ... ч. в Заседателната зала в сградата на База 3 на ИБЕИ – БАН, ул. Акад. Георги Бончев, бл. 23, на открито заседание на Научното жури (назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ-БАН, № 2024 г.) в състав:

доц. д-р Иванка Семерджиева, ИБЕИ – БАН

д.с.с.н. проф. д-р Нидал Шабан, Лесотехнически Университет – София

проф. д-р Лиляна Начева, Институт по овощарство – Пловдив, ССА

доц. д-р Мария Проконова Генева – ИФРГ – БАН

доц. д-р Милена Христова Йорданова – Лесотехнически Университет – София

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБЕИ – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 23, стая 402.

Използвани съкращения:

ЕС – Електрическа проводимост

ИБЕИ – Институт по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания;

СВ – Cutting board хидропонна система

F&D – Flood & Drain хидропонна система

GA₃ – гиберелинова киселина;

GC/MS – газова хроматография с мас-спектрометрия

GD – Green Diamond

GHE – General Hydroponics

БАВ – биологично-активни вещества;

ppm – части на милион;

IBA – индолил-3-маслена киселина;

mS/cm - милисименс на сантиметър е десетична част от единицата SI за електропроводимост сименс на метър. 1 mS/cm = 0,1 S/m.

1. УВОД

Хидропониката (от гр. „хидро“ – вода и „понос“ - работа) обхваща множество различни методи за отглеждане на растения във водна среда без почва, поради което е по-правилно да се говори за хидропонни технологии. Вместо почва се използват водни разтвори на минерални хранителни вещества, с или без изкуствена среда, като перлит, чакъл, експандирани глинени камъчета, кокосови люспи или друг инертен материал, действащ като механична опора. Корените абсорбират необходимите неорганични йони, разтворени във водата.

Поради многобройните си предимства и приложимост при множество растителни видове, хидропонните технологии навлизат все повече в земеделието. В някои страни те вече се използват в индустриален мащаб за отглеждане на зеленчуци, което води до промяна не само в производителността, а и в качеството. Едно от основните предимства на хидропонното градинарство е значителното увеличаване на добивите. Тъй като хидропонните системи са затворени в структури от парников тип, растенията се култивират при контролирани условия на околната среда (оптимален температурен и светлинен режим) и получават балансирани хранителни вещества според специфичните им нужди. По този начин се избягва зависимостта на продукцията от сезоните, времето, валежите, нашествията от вредители, типа и рН на почвата и свързаните с нея плевели, болести и неприятели. Растенията нарастват по-бързо и са по-здрави, много видове се отглеждат целогодишно, което гарантира разширяване на пазара. Хидропонните технологии се поддават на механизация и автоматизация, пести се площ чрез въвеждане на етажно вертикално земеделие при малки растения, водата се използва много по-ефективно чрез възстановяване и рециклиране на излишния разтвор наред с намалените загуби от изпаряване.

Хидропонното отглеждане на растения има и социален импакт: то изисква висока степен на управленски умения, но е по-малко трудоемко от конвенционалното. Производственият план е стабилен, а производителите на хидропонно градинарство са ангажирани целогодишно. Въпреки че от основаването на съвременната хидропоника са изминали близо 100 години, методите непрекъснато се допълват и усъвършенстват. Интересът към хидропониката непрекъснато нараства и много хора отглеждат растения в домашни условия в хидропонни шкафове на закрито.

Хидропонните технологии се отличават с висока екологичност. От една страна, те изискват значително по-малки количества вода, от друга страна се избягва използването на пестициди, при което се опазват чистотата на почвата и човешкото здраве. Ограничаващи трудности за по-широкото им навлизане в земеделието са значителната първоначална инвестиция за изграждане на хидропонни системи и високите енергийни разходи за поддържане на оптимални температура и осветление в помещенията. За момента те се прилагат предимно за култури с висока икономическа стойност или в страни с благоприятен климат.

В контекста на климатичните промени, хидропонните технологии са много перспективни и се счита, че ще станат определящи за бъдещето на земеделието. Това допълнително мотивира изследователите да работят за развиване на този нов отрасъл. В последните години има разработки, насочени към лечебни растения, особено при видове с консервационен статут или такива, които синтезират и натрупват биологично-активни вещества в корените си. За успешното прилагане на хидропонните технологии при нови видове е необходимо експериментално определяне на оптималното количество и съотношение на отделните компоненти в хранителния разтвор, избор на подходящ тип хидропонна система и субстрат, както и познаване на биологията на

съответния вид и съобразяване със специфичните му изисквания към околната среда. Разработките започват винаги на лабораторно ниво и при благоприятно стечение на обстоятелствата достигат до мащабиране и промишлено производство.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е създаването на протоколи за размножаване и ускоряване растежа на избрани видове лечебни растения и видове с консервационно значение, отличаващи се с трудности при размножаването (ниска кълняемост и/или бавен растеж), посредством прилагане на различни хидропонни технологии. В допълнение е предвидено да се установи дали хидропонно размножените индивиди запазват характерната за вида биосинтетична способност по отношение на вторичните метаболити.

2.2. Задачи

За постигане на целта са поставени следните изследователски задачи:

- 1) Изследване на възможностите за вегетативно размножаване от листа и резници на целеви видове чрез изпитване на различни хидропонни системи (*Haberlea rhodopensis*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus*, *T. zygioides*).
- 2) Сравнителен анализ на ускоряването на растежа на луковици от *Lilium rhodopaeum* и *Hippeastrum papilio*, получени *in vitro* или от семена, при изпитване на различни хидропонни системи и субстрати.
- 3) Изследване на възможностите за семенно размножаване на лечебни и консервационно значими растителни видове (*Haberlea rhodopensis*, *Alkanna tinctoria*, *Salvia officinalis* и *Echinacea purpurea*) чрез изпитване на различни хидропонни системи и субстрати.
- 4) Повишаване степента на оцеляване и ефективността на нарастване чрез хидропонно култивиране на поници (*Alkanna tinctoria*).
- 5) Адаптиране на хидропонно култивираните растения към почвен субстрат във фитотронно помещение и последващо аклиматизиране към оранжерийни условия и на открито в *ex situ* колекциите.
- 6) Сравнителен анализ на резултатите от хроматографско определяне на биологично активните вещества на хидропонно нараснали растения спрямо контролните (*Salvia officinalis*, *Hippeastrum papilio*, *Thymus longedentatus*, *T. zygioides*).

3. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

3.1. Развитие на хидропониката

Счита се, че висящите градини на Семирамида във Вавилон (600 г. пр. Хр.) са първите градини в света, при които е приложено хидропонно отглеждане на растения (Texier, 2014). Има данни, че през XII в. индиански племена от Южна Америка са отглеждали селскостопански култури върху плаващи салове, покрити с вулканична

пепел, богата на хранителни вещества, с цел увеличаване на обработваемите площи (Irfanullah, 2011). При пътешествия си през XIII в., Марко Поло описва плаващи градини в Китай. В началото на XVII в. John Woodward провежда първите експерименти, свързани с храненето на растенията, доказващи, че те усвояват хранителните вещества както от почвата, така и от водата (Texier, 2014). През 1860 г. Julius von Sachs публикува формула на концентриран хранителен разтвор, който чрез разреждане с вода ускорява растежа на растенията. Заедно с агрохимика Wilhelm Knop двамата поставят основите на хидропониката, позната още като безпочвено култивиране (Texier, 2014). За основател на съвременната хидропоника се счита William Gerick, който в периода 1920-1930 г. пренася водни култури от лабораторна на промишлена основа и въвежда термина „хидропоника“. През 1933 г. Dennis Hogland създава подобрена формула на хранителен разтвор, включваща железен хелат, която се използва и до днес в производството на съвременни продукти за хидропонно култивиране. Robert и Alisa Withrow въвеждат първото мащабно приложение на хидропониката и изобретяват „система нутрикултура“, която е на принципа на „заливно-отливна система“ и е послужила като основа за създаването на сегашната Flood and Drain (F&D) система (Texier, 2014). През 60-те години на XX в. е отбелязан подем в хидропониката, свързан с откриване на нови материали: при субстратите се въвежда минералната вата; произвеждат се изкуствени хелати, които спомагат за задържане на микро хранителните вещества в разтвора; в парниковото производство се преминава от стъклени към пластмасови покрития, бетонните хидропонни вани се подменят с пластмасови улеи и плаващи устройства. През 1970 г. Allen Cooper разработва Техника на хранителни слоеве (Nutrient Film Technique, NFT). В средата на 80-те години на XX в. в САЩ и Канада вече са утвърдени две направления: широкомащабно промишлено производство на зеленчуци, плодове и тропически растения, както и хидропонно отглеждане на растения в домашни условия. В Европа хидропонните технологии навлизат малко по-късно, първоначално в Холандия, в която традиционно се отглеждат различни култури и декоративни растения в отопляеми оранжерии. В България първите опити за безпочвено отглеждане започват през 1963-1969 г. в НИЗК „Марица“ Пловдив и във ВСИ „В. Коларов“ – Пловдив, където, ползвайки постиженията на СССР са положени научните основи на това модерно направление в селското стопанство. През 1976 г. започва втори период на развитие, свързан с новите технически постижения и технологични решения у нас и в чужбина (Симидчиев и др., 1983). Понастоящем в България хидропонните технологии се прилагат в растениевъдството, за отглеждане на листни зеленчуци, домати, краставици, ягоди и др., както и декоративни растения (Симидчиев и Каназирска, 2017). В световен мащаб безпочвеното отглеждане на растения се използва все по-широко в страни с развито оранжерийно производство: бивши републики на Съветския съюз, Холандия, Дания, САЩ, Англия, Австралия, Нова Зеландия, Бахамски острови, Африка, Бразилия, Полша, Сингапур, Малайзия и Иран. То намира приложение основно в зеленчукопроизводството и цветарската промишленост (Муртазов и др., 1968; Саруханян и др., 1972; Микаелян и др., 1972). Все по-често се прилага и при производството на лечебни и фармацевтични растителни видове със стопанско значение (Давтян и Майрапетян, 1972). В литературата се съобщава за хидропонно култивиране на лечебни растения, сред които видове от родовете *Mentha*, *Stevia*, *Arnica*, *Ocimum* (Giurgiu et al., 2014), също и за мащабно производство на някои луковични растения като *Polianthes tuberersa*, *Crocus sativus*, *Lilium* хибриди и сортове *Tulipa*, с използване на различни хидропонни системи (Souret & Weathers, 2000; Miller, 2002; Moraghebi & Mohebbi, 2011; Asker, 2015).

3.2. Предимства и недостатъци на хидропонните технологии спрямо конвенционалния метод на отглеждане на растения.

Основните предимства на хидропонното култивиране са: добивът (биомаса, плодове, цветове, корени) се увеличава до няколко пъти; факторите на околната среда се контролират; пространството за култивиране се използва много по-рационално; липсва конкуренция при развитие на растенията, поради отсъствието на плевели; компактно разполагане на корените; разходът на вода е значително по-малък, поради нейното рециклиране; осигурява се лесен достъп до кореновата система и възможност да се наблюдава нейното състояние; хидропониката е чиста технология поради отпадане нуждата от регулярно използване на пестициди; хидропониката дава възможност за отглеждане на култури в екстремни условия за осигуряване на свежа и полезна храна.

Освен предимства хидропонните технологии имат и редица недостатъци, повечето от които са сходни на тези при оранжерийното производство: първоначалната инвестиция при създаване на хидропонно производство е висока; текущите разходи при отглеждане на растения в закрити помещения са високи (за силно осветление, контролиране на температурата, вентилация, мъглуване и др.); при някои видове хидропонното отглеждане е икономически нецелесъобразно; хидропонно отглежданите растения са уязвими при съществени промени в състава на разтвора или на параметрите на околната среда; необходим е добре обучен и високо квалифициран персонал (Симидчиев и Каназирска, 2017).

3.3. Основни характеристики на хидропониката

Съществуват различни хидропонни методи и системи, които отговарят на следните общи изисквания: наличие на хранителен разтвор, който осигурява хранителните вещества на корените; наличие на субстрат, който служи за механична опора на растенията и за обмен на йони; наличие на конструкция, която определя начина на подаване на разтвора към растенията. При избора на хидропонен метод за отглеждане на растения, от изключителна важност е да се знаят специфичните изисквания на вида при усвояване на хранителните вещества.

За минералното хранене на растенията от голямо значение са азотът, фосфорът и калият, наречени „основни елементи“, както и калций, магнезий сяра и желязо, познати общо като макроелементи. Към тази група се отнасят и органичните вещества въглерод, водород и кислород. Освен посочените макроелементи в процеса на хранене на растенията вземат участие и т. нар. „микроелементи“: Cu, Zn, Mn, B, Cl, Na, Ni, Co, Si, Al, Se, V, Mo и др., необходими в много малки количества, но участващи в голям брой ензимни реакции (Вахмистров, 1980).

Съставът на хранителния разтвор е един от най-важните фактори при безпочвеното отглеждане на растения и наподобява този на почвения разтвор. Разтворът трябва да притежава физиологична уравновесеност и използваната вода при приготвянето му да е с добро качеството и състав. При физиологично уравновесения разтвор йоните са в оптимално количество и съотношение за растежа и развитието на растенията. Първоначалната уравновесеност на разтвора се изменя през вегетацията, и концентрацията на йоните (измервана чрез ЕС на разтвора) се поддържа в зависимост от фазата на развитие на растението. Хранителният разтвор обикновено е с pH 5.5-6.5 и трябва да се аерира, да се подменя периодично или да се обогатява с изчерпаните вещества и с кислород. За доброто развитие на растенията, температурата на разтвора трябва да е оптимална (18 °C – 24 °C), особено в кореновата зона (Texier, 2014, Симидчиев и Каназирска, 2017). Качеството на водата в хранителния разтвор е от

първостепенно значение и годността ѝ зависи от: общата концентрация на разтворимите соли; съдържанието на Na, Cl, B и други елементи, които при натрупване в разтвора действат токсично на растенията; съдържанието на бикарбонати и съотношението между тях, както и сумарната концентрация на калия и магнезия; твърдостта на водата. Хранителните разтвори са универсални и специфични за конкретни култури. Най-известни от универсалните са разтворите на Knop (1856), Ellis, Hellriegel (1898) Hoagland и Arnon (1938, преработен през 1950 от Arnon).

3.4. Методи за хидропонно култивиране

Хидропонни методи според средата на развитие на кореновата система

Според средата на развитие на кореновата система, културите се определят като: водна, субстратна и аеропонна. При **метода на водната култура** кореновата система се развива в контейнер с хранителен разтвор, който се разбърква непрекъснато (класическа водна култура) или тече на тънък слой („нутриент“ – филм на Купър), обливайки корените на растенията. Необходимият въздух за корените се вкарва в хранителния разтвор под налягане (Муртазов и др., 1968; Бобошевска и др., 1985; Симидчиев и др., 1983). При **метода на субстратните култури** растенията се отглеждат в твърда среда, към която се прибавя хранителен разтвор. Субстратът трябва да отговаря на следните изисквания: да не отделя токсични вещества; да не променя силно реакцията на разтвора; да притежава висока порьозност, което определя неговата въздухо- и водозадържаща способност; да има висок сорбционен капацитет; да не се разрушава лесно, което би довело до влошаване на дренажа и аерацията на кореновата система; да има добра топлопоглъщателна способност; да има ниско обемно тегло. Субстратите биват следните типове: неорганични, органични и безпочвени смеси. Към неорганичните се отнасят минерална (стъклена вата), скала от лава, пемза, перлит, вермикулит, чакъл, пясък и керамзит (гранули от експандирана глина) (Бобкова и Маханько, 1972; Texier, 2014; Симидчиев и Каназирска, 2017). Към органичните субстрати се отнасят: торфен мъх, кокосови влакна или стърготини, дървесни кори и дървесни трици. Освен посочените субстрати се използват и безпочвени смеси, които съдържат най-малко два компонента от различни типове. Обикновено смесите са от минерални и органични вещества, по-рядко само от минерални. **Методът на аеропонните култури** (аеропоника) е най-новият метод за отглеждане на растения. При него хранителният разтвор се подава посредством дюзи и се разпръсква в мъгловидно състояние до корените на растенията. Растенията се закрепват в отвори на пластмасова плоскост, покриваща празно корито, а корените висят във въздуха. Хранителният разтвор е поставен в резервоар под коритото и през определен период, с помощта на помпа, се подава през къси разпръсквачи с дюзи, под формата на фино раздробен разтвор. Образувалата се мъгла полепва по корените и излишният разтвор се стича обратно в коритото, след което през отвори по гравитачен път преминава в резервоара с хранителен разтвор (Вахмистров, 1980).

Хидропонни методи според начина на подаване на хранителния разтвор

В зависимост от начина на подаване на хранителния разтвор, всички известни методи за безпочвено отглеждане на растенията могат да се обединят в две големи групи: затворена хидропоника (хранителният разтвор циркулира непрекъснато около кореновата система) и отворена хидропоника (хранителният разтвор се подава периодически в проточна система, в зависимост от нуждата на растенията и климатичните условия) (Симидчиев и др., 1983). В допълнение подаването на разтвора до кореновата система може да бъде активно (с циркулация на разтвора, осъществена с помощта на водна помпа) или пасивно (без циркулация на разтвора) (Texier, 2014).

Класификацията на хидропонни системи, различаващи се по начина на подаване на хранителния разтвор, обхваща шест основни метода: фитилна система (Wick system), заливно – отливна (Flood and Drain), технология на тънкия хранителен слой (Nutrient Film Technique – NFT), техника на дълбокия поток (DFT – Deep Flow Technique) наричана още дълбока водна култура (DWC – Deep Water Culture), системи за капково напояване (Drip systems) и аеропоника (Aeroponic) (Texier, 2014).

3.5. Условия на околната среда в закрити помещения (осветление, температура, относителна влажност на въздуха и съдържание на CO₂)

При отглеждане на растения на закрито светлината е един от лимитиращите фактори за тяхното развитие. Това налага използване на изкуствена светлина, като се взема предвид качеството и мощността на лампите, както и отстоянието им от растенията. От качеството на светлината зависи енергията, която растението усвоява, измервана чрез PAR (Photosynthetically Active Radiation) – фотосинтетичното активно излъчване. Установено е, че във фазата на вегетация растенията се нуждаят от синя светлина, а по време на цъфтежа и формиране на плодовете – от червена и жълта. Най-разпространените лампи за отглеждане на растения на закрито са метал халогенните (МН, Metal Halide), които излъчват в синия спектър на светлината, и натриевите лампи с високо налягане (HPS, High Pressure Sodium), които излъчват в червения и жълтия спектър на светлината. Използва се и LED осветление (светодиоди), което може да е с различен спектър на светлината. Отстоянието на лампите от растенията трябва да бъде съобразено с тяхната мощност, за да се гарантира оптимален добив и качество на растенията (Texier, 2014). Относителната влажност на въздуха е друг важен параметър при отглеждане на растения на закрито. Максимален растеж на растенията се постига при относителна влажност на въздуха между 60% и 80% (за оптимално вкореняване на резниците се изисква 90%, за покълване на семената – 60%, а при цъфтеж – не по-висока от 50% за избягване на гъбни зарази). Оптималната температура за повечето растения, отглеждани в оранжерии, е между 17 °C и 28 °C през деня и 15.5 °C и 20 °C през нощта, като тя зависи от фазата на развитие на растенията (Симидчиев и Каназирска, 2017). Обикновено в затворените помещения концентрацията на CO₂ във въздуха е по-ниска от тази в атмосферата, което затруднява фотосинтезата на растенията, затова се регулира с помощта на проветрител или вентилационна система, а понякога се налага допълнително обогатяване на въздуха с CO₂ (Симидчиев и Каназирска, 2017). Относителната влажност на въздуха, температурата и концентрацията на CO₂ във въздуха се влияят взаимно и промяната на стойностите на всеки един от тези параметри води до промяна и в другите, което се отразява на развитието на растенията. В оптималния случай те се контролират чрез компютризирани системи.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ¹

При разработката на дисертационния труд са използвани 11 растителни вида: *Haberlea rhodopensis*, *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus*, *T. zygioides*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Lilium rhodopaeum*, *Hippeastrum papilio*, *Alkanna tinctoria*, *Salvia officinalis* и *Echinacea purpurea*. Подборът на целевите видове е съобразен с

¹ В Дисертацията, раздел Материали и методи е част от публикуваните статии по темата, съгласно чл. 9 от „Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН“, при представяне на дисертацията под форма на скрепени научни публикации. За улеснение, в Автореферата раздел Материали и методи е представен в съответствие с поставените задачи.

поставените задачи, обхващащи изследване на възможностите за вегетативно и семенно размножаване и ускорено нарастване на лечебни и консервационно значими растения при прилагане на различни видове хидропонни системи. При някои от лечебните растителни видове е изследвана и биосинтетичната способност на хидропонно размножените индивиди по отношение на характерните за тях вторичните метаболити.

4.1. Материали и методи, използвани при изследване на възможностите за вегетативно размножаване от листа и резници при хидропонно култивиране

При *Haberlea rhodopensis* като изходен материал за размножаване са използвани свежо събрани листа от популация в Родопите, край с. Ситово, всичките с диаметър 8 cm. За вкореняване на листата са използвани два типа аеро-хидропонни системи: вертикална Green Diamond (GD) General Hydroponics (GHE) (120 бр. листа) и хоризонтална AeroFlo-20 (GHE) (20 бр. листа). На вертикалната система са изпитани 8 варианта, получени при комбинирането на 4 различни субстрата с нетретирани листа и с предварително третирани с 25% IBA на прах листа, по 15 листа във вариант. Използвани субстрати: торфени кубчета, заобиколени от агролава; минерална вата, заобиколени от агролава; перлит в полупропусклива тъкан, заобиколен от агролава или от керамзит. На хоризонталната система са тествани 3 варианта по 20 листа, предварително третирани с 25% IBA на прах. Вариантите се различават по субстрата и по времето на предварително съхранение във влажен перлит: прясно събрани листа в перлит в полупропусклива тъкан, заобиколен от агролава; листа, съхранени във влажен перлит съответно 1 или 6 месеца, поставени в агролава. За контрола са поставени 36 нетретирани листа в перлит. Използван е хранителен разтвор от дестилирана и чешмяна вода в съотношение 3:1, допълнен с Flora Micro[®], Flora Grow[®] и Flora Bloom[®] (GHE) и с бактерията *Trichoderma harzianum* (0.1 g/L); pH на разтвора се поддържа между 5.5 и 6.5, а ЕС между 0.40 и 0.98 mS/cm⁻¹. Експериментите са проведени при смесена дневна и изкуствена светлина с интензивност между 50 и 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16/8 h фотопериод, денонощно вариране на температурата (23 ± 4 °C) и относителна влажност на въздуха 32 до 68%. Статистическите анализи са направени с помощта на Excel Anova: Two Factor Without Replication. Всички процентни данни са трансформирани с помощта на формулата на Excel: ASIN(SQRT), за да се нормализира разпределението на грешките преди анализ на дисперсията.

При *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus* и *T. zygioides* са използвани резници, дълги около 10 cm, събрани от едно и също местообитание в Източни Родопи, близо до с. Горни Главанак. Тествани са 4 варианта, от които 3 на хидропонна система F&D по един за всеки вид от мащерките и контрола в почвена смеска Light mix Biobizz[®]. При всеки вариант са използвани по 20 резника, половината от които са третирани с 0.25% прах IBA, а другата половина нетретирани. При хидропонното вкореняване на система F&D е използван субстрат перлит, който се наводнява с хранителен разтвор 4 пъти на ден за 15 минути, с помощта на водна помпа. Хранителният разтвор съдържа Flora Micro[®], Flora Grow[®] и Flora Bloom[®] (GHE), в съотношение 1:1:1, разреждени във вода при pH 5.5-6.5, ЕС от 0.4 mS/cm⁻¹ до 1.2 mS/cm⁻¹ (в период от вкореняване до цъфтеж). Култивирането се извършва във фитотронно помещение при 16/8h светлинен режим, температура 22 ± 3 °C и относителна влажност на въздуха между 36% и 72%. Паралелно, на плот с почва в неотопляемата оранжерия на ИБЕИ като сравнителна контрола са поставени за вкореняване 120 резника от всеки вид, произхождащи от същите популации, третирани със същата концентрация на IBA, на около 1 m² за всеки вид.

За размножаване на резници от *Vaccinium vitis-idaea* и *Arctostaphylos uva-ursi*, изходният растителен материал е събран от популации на Витоша с дължина от 10 до 15

см: млади зелени връхчета, полувдървесинени и вдървесинени леторасти. Използвани са общо 60 резници за вид: по 20 за всеки тип за *V. vitis-idaea*, като половината от тях са третирани с ауксин в 25% прахообразна ИВА преди поставянето им в субстрат, докато при *A. uva-ursi* 30 млади зелени връхчета са третирани с ИВА по същия начин, а 30 полувдървесинени са нетретирани. И при двата вида е използвана хидропонна система F&D със субстрат перлит, навлажняван периодично (15 минути на всеки 6 часа) с хранителен разтвор, състоящ се от дестилирана вода, допълнена с Flora Micro[®], Flora Grow[®] и Flora Bloom[®] (GHE) в съотношение 1:1:1; pH се поддържа между 5.5 и 6.5, а ЕС между 0.40 и 0.80 mS/cm⁻¹. Температурата, светлината и влажността на въздуха в фитотронното помещение се контролират както следва: 23±4 °C; 16/8 ч. фотопериод; относителна влажност на въздуха, варираща денонощно между 45% и 75%. В допълнение са поставени контроли от по 20 резници от всеки вид в смес от почвен субстрат Light mix Biobizz[®] и агролава (2:1) за вкореняване във фитотрона. Всички оцелели резници са засадени в същия субстрат като контролата и след 6 седмици адаптация във фитотрона са прехвърлени в неотопляема оранжерия.

4.2. Материали и методи, използвани при изследване на възможностите за ускоряване на растежа на луковични растения при хидропонно култивиране

За ускоряване растежа на луковици на *Lilium rhodopaeum* са проведени два последователни експеримента, с общо 99 *in vitro* размножени и вкоренени луковички, при изпитване на две хидропонни системи: СВ за 27 растения и F&D, както и контролен вариант фитилна система (почвен субстрат: Light mix Biobizz[®], кокосови влакна и пясък в съотношение 2:1:1). При първия експеримент, на СВ са отгледани 27 *in vitro* луковички (с тегло от 0.05 g до 2.20 g) в мрежести саксии, запълнени със субстрат от биоразградими торфени кубчета (Root!t[®]), заобиколени от керамзит. Хранителният разтвор се състои от чешмяна и дестилирана вода (3:1 v/v), допълнена с разтвори Flora Micro[®], Flora Gro[®] и Flora Bloom[®] (GHE) в еднаква концентрация, pH се поддържа между 5.5 и 6.5, ЕС се повишава постепенно в границите от 0.6 mS/cm⁻¹ в началото до 2.3 mS/cm⁻¹ в следващите месеци. Поради слабите корени на *in vitro* луковичките, към хранителния разтвор са добавени прах от *Trichoderma harzianum* (0.1 g/l) и First feed (Root!t[®]) (15 ml/L). Във фитотронното помещение се поддържа температура 21±3 °C, използвана е смесена светлина: естествена и осигурена от лампа Enviro Gro (600 W) при светлинен режим 16/8 часа. При втория експеримент 72 *in vitro* луковички (с тегло от 0.03 g до 0.50 g) са разпределени поравно в контролния вариант и в системите СВ и F&D (със субстрат перлит, който се залива с хранителния разтвор 15 минути на всеки 6 часа с помощта на водна помпа). Използван е същият хранителен разтвор (без *T. harzianum* поради по-добре развитите корени) и са поддържани същите условия във фитотрона. Продължителността на всички експерименти е 8 месеца, след което всички луковици са прехвърлени в саксии с почвена смес и след 2 месеца са адаптирани към оранжерийни условия. Част от растенията са аклиматизирани на открито в *ex situ* колекцията на ИБЕИ (550 m н.м.в.). Статистическата обработка на резултатите е направена с помощта на ABC анализ (Thrun et al., 2017) при класифициране на луковиците в 3 групи според крайното им тегло, тъй като то е предпоставка за оцеляването на растенията след пренасянето им на открито.

При *Hippeastrum papilio* са използвани 60 двумесечни семенно размножени луковици (средно тегло 0.60 ± 0.34 g) и 33 *in vitro* получени добре оформени и вкоренени луковици (средно тегло 1.94 ± 1.34 g). Семенно размножените луковици са равномерно разпределени в 3 варианта, по 20 растения във вариант, на система СВ (в мрежести саксии с керамзит), F&D (субстрат перлит) и терина с почвен субстрат (Light mix, Biobizz[®]) като контрола. *In vitro* луковиците са отгледани само на F&D при същите

условия. При всички варианти хранителният разтвор се състои от дестилирана и чешмяна вода (3:1), допълнена с Flora Micro[®], Flora Grow[®] и Flora Bloom[®] (GHE) (в съотношение 1:1:1) с ЕС между 0.40 и 0.98 mS/cm⁻¹ и рН между 5.5 и 6.5. При система СВ разтворът се аерира постоянно с помощта на аквариумна помпа и въздушно камъче, а при F&D перлитът се наводнява за 15 минути на всеки 6 ч. с помощта на водна помпа. Във фитотронното помещение се поддържа температура 23 ± 2 °C, влажност на въздуха $56 \pm 18\%$ и смесена дневна и изкуствена светлина с 16/8 ч. фотопериод. Продължителността на експеримента е 16 седмици, след което са измерени теглото и диаметърът на всички луковици и са прехвърлени в саксии с почвен субстрат за 2-месечна адаптация. Статистическата обработка на резултатите е извършена с Excel ANOVA single factor.

4.3 Материали и методи, използвани при изследване на възможностите за семенно размножаване на целеви видове при хидропонно култивиране

При *Haberlea rhodopensis* са проведени експерименти за размножаване от семена, събрани от популация в Родопите, край с. Ситово. Семената са стратифицирани предварително в продължение на 2 седмици в хладилник при 6 °C, след което са засети на хидропонна система СВ с 27 мрежести саксии, запълнени с торфени кубчета, заобиколени от агролава. Използван е стандартен хранителен разтвор (рН 5.5-6.5; ЕС 0.4-0.6 mS/cm⁻¹), който се аерира с помощта на камъче, свързано с въздушна помпа. През първия месец субстратът е покрит с черен полиетилен (за стимулиране на кълняемостта), а след поникването на първите семена те са изложени на смесена дневна и изкуствена светлина между 22 и 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, с фотопериод 16/8 ч. Контролни семена (10 броя) са поставени в терина с прозрачен капак, върху субстрат кубчета от кокосови влакна, навлажнени с вода.

При *Alkanna tinctoria* са събрани семена от 4 естествени популации до селата Илинденци, Микрево, Генерал Тодоров и Струма, по поречието на р. Струма. Проведени са различни тестове за покълване на семената: *in vivo*, *in vitro*, в почвен субстрат и на хидропонна система с по 30 семена от всяка популация. За почвения тест семената са поставени в терина с лека почва и пясък в съотношение 1:1, във фитотронно помещение, при естествена дневна светлина и температура между 20 и 26 °C. За хидропонно размножаване е използвана система СВ с 27 мрежести саксии с торфени кубчета върху керамзит (5 семена на кубче), във фитотрон при температура 23 ± 2 °C и 16/8 ч. фотопериод за 6 седмици. Използваният хранителен разтвор се състои от вода и равни количества от Flora Micro[®], Flora Grow[®] и Flora Bloom[®] (GHE) и се поддържа с рН между 5.5 и 6.5 и ЕС между 0.40 и 0.98. mS/cm⁻¹. За стимулиране покълването на семената са тествани 2 фактора: накисване в GA₃ и облъчване с монохроматични светодиоди (LED). Използвани са по 180 семена от популация, разпределени в 2 последователни опита. Половината са предварително третирани с 0.35% GA₃ за 4 ч., а контролните са накисвани във вода за същото време. Всички семена са поставени в петриеви блюда, в 3 камери при постоянна температура от 21 ± 1 °C, при 12 ч. осветяване в денонощие с червена (660 nm), синя (469 nm) и инфрачервена (730 nm) светлина, до една седмица след края на покълването. Произходът на семената се счита за трети фактор с потенциално влияние върху покълването им, в резултат на което са сравнени 24 варианта, по 30 семена на вариант. Статистическата обработка на резултатите е извършена с Excel t-test paired. Семеначетата са прехвърлени първо в епруветки с перлит за укрепване и след това върху хидропонна система СВ за нарастване. Растенията са засадени в почвен субстрат (Light mix Biobizz[®] и пясък, в съотношение 2:1) и адаптирани във фитотронно помещение.

При *Salvia officinalis* като изходен материал са използвани семена от култивирани растения за получаване на разсад по два метода: хидропонен и почвен (конвенционален) като контрола, по 80 семена. Хидропонното размножаване е на аеро-хидропонна вертикална система GD (GHE) със субстрат торфени кубчета заобиколени с керамзит. Хранителният разтвор в началото на експеримента се състои от дестилирана вода с добавени 6 ml/L First Feed (Root It®) с pH 5.5-6.5 и EC 1 mS/cm⁻¹, а след развитие на коренова система е заменен с по-подходящ за този етап, съдържащ по 0.7 ml/L от хранителните разтвори Flora Micro®, Flora Grow® и Flora Bloom® (GHE). Периодът на отглеждане от засяване до получаване на разсад е 7 месеца при контролния и 3 месеца при хидропонния вариант (засети съответно ноември 2014 и април 2015). Измерени са морфометричните показатели на всички разсади от двата варианта и са прехвърлени в саксии със стерилизиран компост и универсална почвена смес в съотношение 2:1, поставени за адаптация в оранжерия. След 2 месеца, по 36 разсада от двата варианта са засадени на открито в експерименталните площи на ИБЕИ. На следващата година са събрани проби от 10 произволно избрани растения от всеки вариант по време на пълен цъфтеж, които са изсушени и подготвени за фитохимичен анализ. Двата варианта са сравнени на база преживяемост на растенията, цъфтеж и индивидуална оценка на свежо и сухо тегло, брой вегетативни и генеративни леторасти, брой разклонения и листа, както и количество и състав на етеричните масла. Получените данни са статистически анализирани с Excel ANOVA Single factor.

За размножаване на *Echinacea purpurea* са събрани зрели семена от растения от *ex situ* колекцията на ИБЕИ и са съхранявани в хладна камера през зимата. Няколко стотици от тях са използвани за контрола и са засети в почва на плот в оранжерията през октомври, а през май полученият разсад е прехвърлен на откритите площи в двора на оранжерията. Друга част от семената са третираны по различни начини, за стимулиране на кълняемостта: семената са трикратно потопени последователно в гореща и леденостудена вода, след това накиснати за един час в GA₃ (0.1% или 0.35%) или 0.2% KNO₃; контролните семена са накиснати в дестилирана вода за същото време. Всеки от четирите варианта се състои от 30 семена и е разделен на два подварианта от 15 небелени и 15 обелени преди третирането семена. Семената са засети в терини с почвена смес и поставени във фитотронно помещение. След един месец е отчетен броят на покълналите семена. В паралелен експеримент е изследвана кълняемостта на семената на аеро-хидропонна система GD, с прилагане на същите стимулиращи агенти, по 30 семена на вариант (2 повторения по 15 обелени семена). Семената са поставени в субстрат торфени органични кубчета, центрирани в пластмасови решетъчни саксии, запълнени с керамзит, по едно семе в саксия. В началото на експеримента се използва вода с вкоренител Root It® first feed, 15 ml/L (GHE) до поникването на първите семена, 5 седмици по-късно в разтвора са добавени Flora gro®, Flora micro® и Flora bloom® в концентрация 0.7 ml/L. Разтворът (с pH между 5.4 и 6.5 и EC в диапазона 1.8 ± 0.6 mS/cm⁻¹) се разпръсква през дюзи на фини капки за 15 минути на всеки 3 часа. Условиата на околната среда във фитотрона са: светлинен режим 16 часа светлина на денонощие (металхалогенна лампа, 600 W, пълен спектър), температура 23±4°C и относителна влажност на въздуха между 32 и 52 %. След 74 дни е измерена дължината на корените и растенията са засадени в почвена смес Light mix Biobizz®. След 2 месеца адаптация (по 1 месец във фитотрона и в оранжерия) растенията са аклиматизирани на откритото в експериментално поле на ИБЕИ. Резултатите са анализирани статистически с помощта на Excel ANOVA Single factor и Excel ANOVA Two-factor with replication.

4.4. Материали и методи, използвани при сравнително определяне на биологично-активните вещества на хидропонно нараснали и контролни растения.

При *Salvia officinalis* е направена екстракция на етерично масло с апарат Clevenger чрез водна дестилация на взети проби от по 50 g сухо вещество, състоящи се от листа и съцветия на отделни растения, в колба с 500 ml вода, в продължение на 2 часа. Направен е хроматографски анализ на състава на маслото с помощта на GC/MS. Анализът на маслото е повторен през следващата година.

За фитохимичния анализ на *Hippeastrum papilio* са подготвени сборни проби, състоящи се от листа от различни растения от един и същи вариант (около 20g свежо тегло, една сборна проба на вариант). Алкалоидите са екстрахирани с метанол, след което алкалоидният състав в тоталната смес е определен чрез GC/MS анализ.

При *Thymus longedentatus* и *T. zygoides* е направена метанолна екстракция на метаболитите в проби от сух, прахообразен растителен материал (100 mg) от хидропонно отгледани стръкове, събрани по време на масов цъфтеж. Метаболитните профили на пробите са определени чрез GC/MS анализ.

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Изследване на възможностите за вегетативно размножаване от листа и резници на целеви видове при хидропонно култивиране

5.1.1 Хидропонно вегетативно размножаване на *Haberlea rhodopensis* от листа, с използване на аеро-хидропонни системи: вертикална Green Diamond и хоризонтална Aeroflo-20 (Публикация № 1)

Вкореняването на листата и образуването на розетки отнема 6 месеца и при двете аеро-хидропонни системи, като са забелязани някои разлики.

Установено е, че на вкореняването на листата и формирането на розетки, отглеждани върху вертикалната система **Green Diamond**, влияят субстратът и третирането с IBA (Табл. 1). При повечето варианти процентите на вкореняване и оцеляване на листата са относително високи: 60.0 до 86.7%. По отношение на процента на вкореняване на листата няма статистически значими разлики между вариантите различаващи се по субстрата или по третирането с IBA (Табл. 1-А). Въпреки това, някои варианти се различават по отношение на качеството на корените и времето за тяхното образуване. Най-добри резултати са получени във вариант Р-АР-IBA, където всички оцелели листа развиват силна коренова система за 12 седмици. При останалите варианти корените се развиват за 8-12 седмици. Органичният торфен субстрат е неподходящ и корените във варианти РС-АР-С и РС-АР-IBA остават къси и слаби, много листа окапват и се образуват само няколко розетки.

Изборът на субстрат е много важен за успеха на безпочвеното отглеждане. Това зависи от биологичните изискванията на растителния вид, както и от начина на овлажняване на субстрата (Giurgiu et al., 2014). Определянето на оптималните условия зависи от съотношението между разтвора и въздуха вътре в субстрата, което е важно за растежа на корените и преовлажняването им може да предизвика гниене. Например минерална вата задържа 80% от хранителния разтвор и съдържа 15% въздух, докато нейните влакна представляват само 5% от субстрата. Giurgiu et al., (2014) препоръчват като добър субстрат перлит с размер на фракцията между 2 и 7 mm в диаметър. Сред субстратите, използвани в настоящия експеримент, перлитът има по-добра

проницаемост в сравнение с минералната вата и торфените кубчета, а агролавата и керамзитът са с по-големи размери на фракцията от перлита.

На третия месец от началото на експеримента се образуват единични розетки на вече вкоренените листа от *H. rhodopensis*, а на шестия месец половината от оцелелите листа са с розетки (38 от 76 вкоренени листа). Общият брой на добре оформените розетки с по 4-6 листа и диаметър между 4 и 8 cm, получени във всички варианти, е 71, като 63.4% от тях се образуват при вариантите, стимулирани с IBA (Табл. 1). Най-голям брой големи розетки са отчетени при варианти P-AP-IBA и MW-AP-IBA: съответно 20 и 17, докато при съответните контролни варианти P-AP-C и MW-AP-C техният брой е много по-малък ($p < 0.05$, Табл. 1-C). Образоването на розетки е значително подобро чрез третиране с IBA ($p < 0.05$, Табл. 1-B). Средният брой розетки на лист в тези варианти е два пъти по-висок когато листата са третирани с IBA, като най-голям брой розетки 2.9 е регистриран при вариант P-AP-IBA (Табл. 1). Не се забелязва значима разлика между трите субстрата по отношение на процента на листата, образувачи розетки (Табл. 1-B). По отношение на всички параметри: вкореняване и образуване на розетки, като най-добър се отличава вариант P-AP-IBA на вертикалната система GD.

Табл. 1. Вкореняване на листата и образуване на розетки върху вертикалната аеро-хидропонна система за 6 месеца. Ефект на субстрата и IBA-третирането върху вкореняването на листата (A), образуването на розетки (B) и броя на големите розетки (C), оценени с Excel ANOVA Two-factor without replication analysis.

Вариант	Вкоренени листа (%)	Листа с розетки (%)	Брой големи розетки	Големи розетки на лист
PC-AP-C	53.3	13.3	2	1.0
PC-AP-IBA	46.7	6.7	1	1.0
MW-AP-C	73.3	33.3	6	1.2
MW-AP-IBA	66.7	46.7	17*	2.4
P-AP-C	60.0	40.0	8	1.3
P-AP-IBA	86.7	46.7	20*	2.9
P-KP-C	66.7	26.7	10	2.5
P-KP-IBA	53.3	40.0	7*	1.2

* плюс допълнителни малки розетки

Легенда: PC – торфени кубчета; AP – камъчета агролава; IBA – третирани с IBA листа; B – контролни нетретирани листа; MW – минерална вата; P – перлит; KP – керамзитни пелети.

(A)

Source of variation	Df	MS	F	p-value
Substrate type	3	0.026007676	1.247809922	0.42995825
IBA Treatment	1	0.000162102	0.007777413	0.935283122
Error	3	0.020842658		

(B)

Source of variation	Df	MS	F	p-value
Substrate type	2	0.005684031	6.592599167	0.131707203
IBA Treatment	1	0.020022653	23.22319022	0.040464754
Error	2	0.000862184		

(C)

Source of variation	Df	MS	F	p-value
Substrate type	1	6.25	25.0	0.126
IBA Treatment	1	132.25	529.0	0.028
Error	1	0.25		

При хоризонталната система **Aeroflo-20** разликите във възрастта и състоянието на листата се оказват от решаващо значение (Табл. 2). Предварителното вкореняване на листата при вариант AP-6m-L улеснява образуването на розетки (85%): те са многобройни и добре оформени, растат по-бързо и достигат размер, подходящ за засаждане в почвена смес, само за месец и половина. Във вариант AP-1m-L със същия субстрат, листните дръжки образуват калусна тъкан поради третирането с ИВА и повечето развиват корени, но само 25% от листата образуват розетки, като половината от тях са клъстери от миниатюрни розетки. Най-лоши резултати са получени във варианта с пряно събрани листа, поставени на Aeroflo-20 без предварително вкореняване в перлит (P-AP-FL), поради трудности с вкореняването.

Табл. 2. Формиране на розетки на хоризонталната аеро-хидропонна система Aeroflo-20.

Вариант	Време	Листа с розетки (%)	Брой от добре оформени розетки	Брой клъстери от малки розетки
P-AP-FL	6 months	10.0	1	1
AP-6m L	1.5 months	85.0	38	0
AP-1m L	2 months	25.0	2	3

Легенда: P – перлит; AP – агролава; FL – пряно събрани листа; L – листа, съхранявани във влажен перлит: 6m – за 6 месеца, 1m – за един месец.

При сравняване на двете аеро-хидропонни системи са установени важни разлики, свързани с начина на овлажняване на субстрата (Фиг. 1). При хоризонталната система излишният разтвор не може да се оттеди поради уплътняване на перлита, което причинява преовлажняване, докато при вертикалната система дренажът е по-добър. По-едрата фракция от агролава, приложена самостоятелно, е най-подходяща за хоризонталната система, но под повърхността на субстрата се образуват розетки, които етиолират. Младите корени, образувани при вариант AP-1m-L в агролавата, са уязвими към преовлажняване от хранителния разтвор, което причинява частично гниене. Въпреки че 16 листа се вкорениха (80%), само 6 от тях оцеляха и накрая 5 листа образуваха една добре оформена розетка или клъстер от 4 до 7 малки розетки (Табл. 2).



Фиг. 1. Образуване на розетки на *H. rhodopensis* върху аерохидропонни системи: а) Вертикална GD; б) Хоризонтална Aeroflo-20; в) Корени в P-AP-IBA, на 12 седмици; д) Многобройни розетки в основата на листата при MW-AP-IBA; е) Единична розетка, формирана в MW-AP-C; ф) Формирани розетки на Aeroflo-20 в AP-6m-L; г) Етиолирана розетка под агролавата; х) Частично загниване на кореновата система; и) Развитие на водорасли върху субстрата. Скала = 10 mm.

Адаптиране на розетките. Седем месеца след прехвърлянето на вкоренените растения в почвена смес, броят на образуваните розетки във вертикалната система GD намалява почти два пъти (47.9% оцелели розетки) и ефектът от ИВА се губи в дългосрочен период, тъй като повечето от по-малките розетки умират. След пренасяне на растенията в почвена смес рядко се образуват нови розетки. При прехвърляне на оцелелите розетки в оранжерия за последваща адаптация, те достигат до размери с диаметър над 10 cm и височина около 7 cm и са с няколко добре оформени листа (Фиг. 2-а). Розетките, получени на хоризонталната система AeroFlo-20 (вариант AP-6m-L) и прехвърлени в почвена смес 2 месеца по-късно, са с диаметър около 7 cm (Фиг. 2-б). Младите розетки в естествените популации имат 4-6 листа, а множество зрели растения растат близо едно до друго, като дължината на листата зависи от условията на околната среда (Фиг. 2-с). Общо 47 розетки (34 получени на вертикалната и 13 на хоризонталната аеро-хидропонни системи) са адаптирани в оранжерия.



Фиг. 2. Засадени розетки и растения в природата: **а)** Розетки, образувани върху вертикалната GD система, 7 месеца след засаждането; **б)** Розетка, образувана върху хоризонтална AeroFlo-20 система, 5 месеца след засаждането; **с)** Растения в естествено местообитание.

В литературата има много данни за вторичните метаболити при *H. rhodopensis*, но малкото опити за размножаване на вида при *ex situ* условия са неуспешни поради образуване на изключително малки и нежизнеспособни розетки в лека почва (Bogacheva-Milkoteva et al., 2013) или трудности при адаптацията на *in vitro* размножени розетки ((Djilianov et al., 2005). Като се има предвид бавната скорост на растеж на родопския силивряк в природата, резултатите, получени при хидропонно вкореняване на листа и образуване на розетки с последваща адаптация в почва са обещаващи. Най-големите розетки нараснаха само за една година и започнаха да цъфтят на третата година в оранжерийни условия (резултат след излизане на Публикация № 1).

5.1.2 Хидропонно вегетативно размножаване на *Vaccinium vitis-idaea* и *Arctostaphylos uva-ursi* от резници, на хидропонна система Flood and Drain (Публикация № 8)

При хидропонно култивиране на *V. vitis-idaea* на система F&D със субстрат перлит резултатите показват, че възрастта на резниците (млади, полувдървесинели и вдървесинели) е от определящо значение. Най-успешно се вкореняват и оцеляват полувдървесинелите резници, третирани с ИВА: 100%, докато при нетретирани от този тип оцеляват 60%. За сравнение, само 50% от вдървесинелите и 30% от младите резници оцеляват, независимо от третирането с ИВА. Почти всички млади вкоренени резници образуват нови издънки, чийто среден брой на резник варира между 1.7 ± 0.6 (за нетретирани) и 3.0 ± 1.0 (за третирани). Резниците от контролата (почвен субстрат и перлит, 2:1) не оцеляват. От общо 32 саксии със засадени растения в почва, 62.5% са успешно аклиматизирани и презимуват в оранжерията. Най-подходящи за хидропонно размножаване са вдървесинелите резници поради най-високия процент успешно аклиматизирани: 50%, докато презимуващите полувдървесинели и млади са

съответно 35% и 15%. Две години след засаждането в почва, оцелелите растения достигат до цъфтеж в оранжерията.

При *A. uva-ursi* вкоренените и оцелели резници са много по-малко: 3.3% от младите, третираните с ИВА, и 10% от полувдървесинелите нетретираните. Това вероятно се дължи на сезонните особености, тъй като експериментът започна през октомври. Третираните с ИВА резници развиват до 4 допълнителни издънки в основата и във възлите, докато нетретираните растат само на височина. Контролните резници в почвения субстрат не оцеляват.

5.1.3 Хидропонно вегетативно размножаване на *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus* и *T. zygioides* от резници, на хидропонна система Flood and Drain (Публикация № 6)

Растежът и развитието на растенията зависят както от растителния вид, така и от условията на култивиране. Вкореняването и оцеляването на резниците от трите вида мащерка (*Thymus pannonicus*, *T. zygioides* и *T. longedentatus*) е много по-успешно на хидропонна система F&D със субстрат перлит, в сравнение с контролата в почвен субстрат, благодарение на по-добре развитата коренова система. Третирането с ИВА не е от значение за вкореняване на резниците. На хидропонната система повечето от резници се вкореняват за кратко време (около 20 дни) и се разклоняват, но *T. pannonicus* достига етап на цъфтеж само за 3 седмици, докато *T. zygioides* и *T. longedentatus* се нуждаят съответно от 4 и 6 седмици. Масов цъфтеж се наблюдава една седмица след началото на цъфтежа. При контролния вариант също се наблюдава цъфтеж първо при *T. pannonicus*. Този вид се оказва по-чувствителен към преовлажняване и в условията на фитотрона е податлив на брашнеста мана, успешно преодоляна чрез третиране с фунгицид. В естествените популации периодът на цъфтеж е по-дълъг, от 3 до 5 месеца: април до август за *T. zygioides*, май до юли за *T. longedentatus* и май до септември за *T. pannonicus* (Markova 1989).

На F&D системата ефективността на размножаване е най-висока при *T. zygioides*, тъй като стъблата на този вид са склонни да пълзят и образуват корени и нови издънки във възлите, докато другите два вида са по-изправени. Известно е, че трите вида се различават по своята морфология на стъблото, като при *T. zygioides* стъблата са пълзящи и образуват корени и издънки в почти всички възли, за разлика от другите два вида (Маркова 1989), което обяснява разликата в тяхната репродуктивна ефективност и в условията на хидропонно култивиране. Въпреки че някои резници не се вкорениха, крайният брой на растенията се увеличи благодарение на образуването на корени и нови растения, израстващи от възлите. В края на 3-месечното култивиране получените растения при *T. zygioides* са 120% в сравнение с първоначалния брой резници и 105% при *T. pannonicus* и *T. longedentatus*. Растенията са прехвърлени в саксии с почвен субстрат и оставени във фитотрона за адаптация. След един месец, през есента, са пренесени в неотопляемата оранжерия на ИБЕИ, където успешно презимуват.

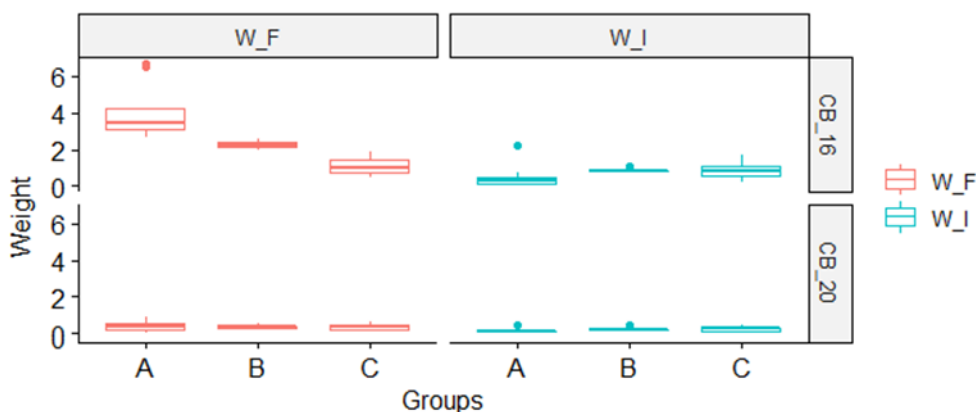
От контролните резници от трите вида, поставени в късната есен за вкореняване директно в почва на плота в неотопляемата оранжерия на ИБЕИ, само малка част се вкорениха и образуваха нови стъбла през пролетта, а на втората година покриха отредената им площ. Отбелязани са различия в плътността на покривката: при *T. longedentatus* се наблюдава плътно покритие, *T. zygioides* образува плътни туфи с разстояние между тях, а *T. pannonicus* оформя рехави туфи.

5.2. Изследване на възможностите за ускоряване растежа на луковични растения при хидропонно култивиране

5.2.1. Ускоряване растежа на *in vitro* получени луковичи от *Lilium rhodopaeum* при изпитване на хидропонни системи Cutting board и Flood and Drain при различни субстрати (Публикация № 2)

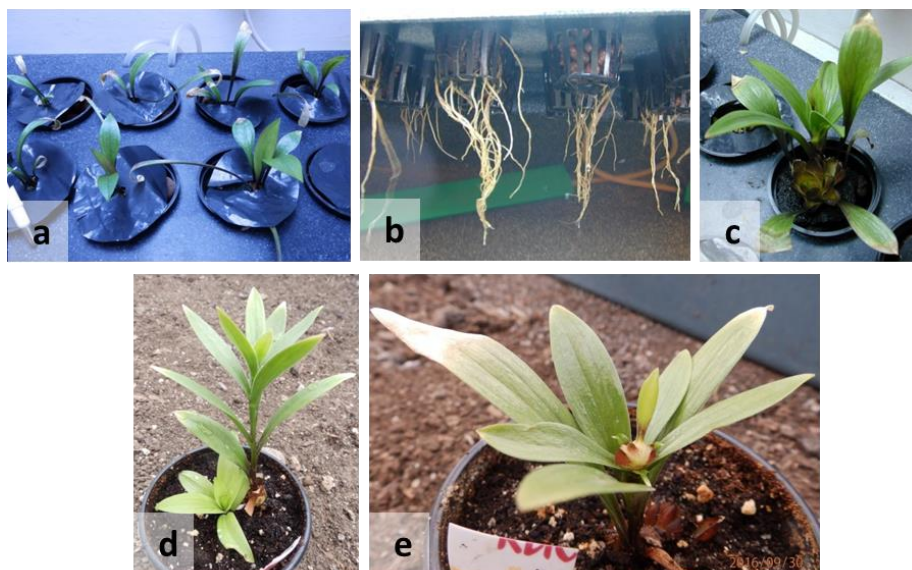
Изследванията върху ускоряване растежа на *in vitro* получени луковички от *L. rhodopaeum* е проведено в два последователни експеримента: през 2016 г. на хидропонна система СВ и през 2020 г. на СВ и на F&D, с различни субстрати.

При сравнение на резултатите на система СВ от 2016 г. и 2020 г. ясно се очертава значението както на субстрата, така и на присъствието на бактерията *Trichoderma harzianum* и на First feed (Root!t[®]) в разтвора. Порестата структура на въздух-пропускливите биоразградими торфени кубчета, използвани в първия експеримент, се оказва много подходящ субстрат за луковичите на *L. rhodopaeum*, докато плътните торфени кубчета, при втория експеримент, най-вероятно причиняват преовлажняване и гниене на корените. Влиянието на съдържанието на въздух в субстрата върху растежа на корените е разгледано подробно от Giurgiu et al. (2014). Въпреки по-добре развитите корени на изходните луковички при втория експеримент, оцеляването и развитието на луковичките е много по-успешно при първия (Фиг. 3). При експеримента на СВ през 2016 г. в края на третия месец всички луковичи образуват от 2 до 5 листа и добре развита коренова система, потопена в хранителния разтвор; от оцелелите 26 луковичи (от общо 27), 6 образуват общо 15 нови луковички в основата си, а след прехвърлянето им в саксии с почвена смес някои образуват дори и цветоносно стъбло, което в природата се развива през втората или третата година (Фиг. 4). Сходно влияние на субстрата и на *T. harzianum* е установено и при размножаване на розетките на *Haberlea rhodopaensis* в аерохидропонна система GD (Traykova and Stanilova 2020), а благоприятното влияние на бактерията върху растежа на корените е съобщено при хидропонно култивиране и на други видове растения (Harman, 2000).



Фиг. 3. Box-plot диаграми, представящи растежа на луковичи от *L. rhodopaeum* в хидропонната система СВ през 2016 г. (CB_16) и през 2020 г. (CB_20). (W_F – крайно тегло на луковичи; W_I – начално тегло на луковичи; A, B и C – групи, получени чрез ABC анализ)

Статистическият анализ показва, че първоначалния размер на луковичите не е от съществено значение. Класификацията на стойностите на крайното тегло на луковичите с помощта на ABC анализ води до формиране на 3 неприпокриващи се групи при нива: „високо“ – A, „средно“ – B и „ниско“ – C (Фиг. 3). Луковичите в група A увеличават първоначалното си тегло над 8 пъти, което е свързано с качеството на кореновата им система в началото на експеримента (Табл. 3).



Фиг. 4. Първи експеримент с *L. rhodopaeum* на хидропонна система СВ: а) Растения, гледани отгоре; б) Корени, поглед отдолу; в) Растение, образувало допълнителна луковича в основата; д) Растение, адаптирано към почва, с цветоносно стъбло; е) Растение, образувашо луковича на върха на цветоносното стъбло.

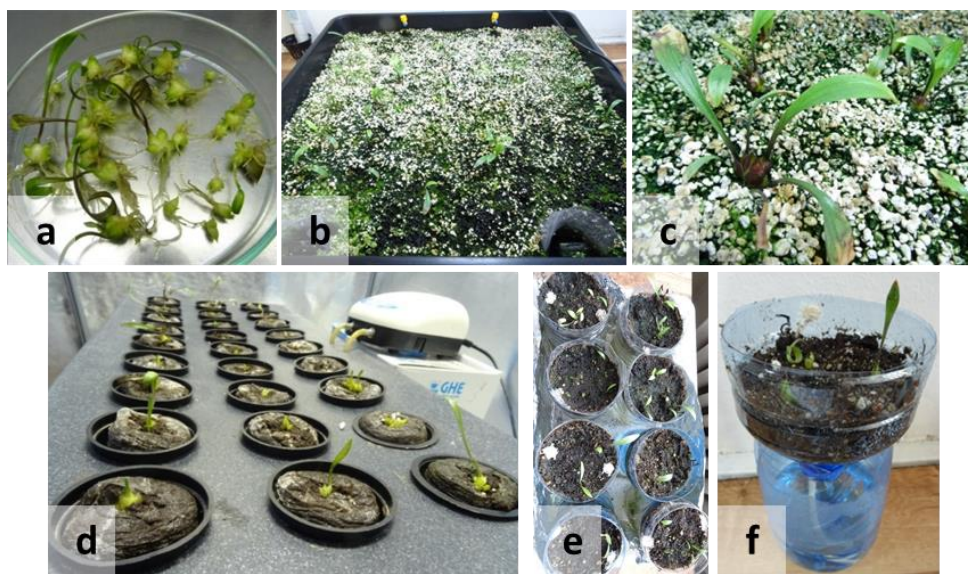
Табл. 3. Ефективност на растежа на луковичите в успешните варианти, оценени като „нараснало тегло в пъти“ по групи, класифицирани според крайното тегло, след 8 месечно отглеждане (CB_F и CB_I – крайно и начално тегло на СВ система през 2016 г.; FD_F и FD_I – крайно и начално тегло на F&D система).

Variant	Bulblets	Group A	Group B	Group C
Cutting board hydroponic system – 2016	CB_F [g]	4.09±1.50	2.26±0.23	1.09±0.45
	CB_I [g]	0.50±0.67	0.85±0.12	0.88±0.46
	Times of growth	8.1	2.6	1.2
Flood & Drain hydroponic system – 2020	FD_F [g]	3.71±0.97	1.97±0.19	1.15±0.52
	FD_I [g]	0.17±0.13	0.35±0.16	0.16±0.19
	Times of growth	21.7	5.7	7.2

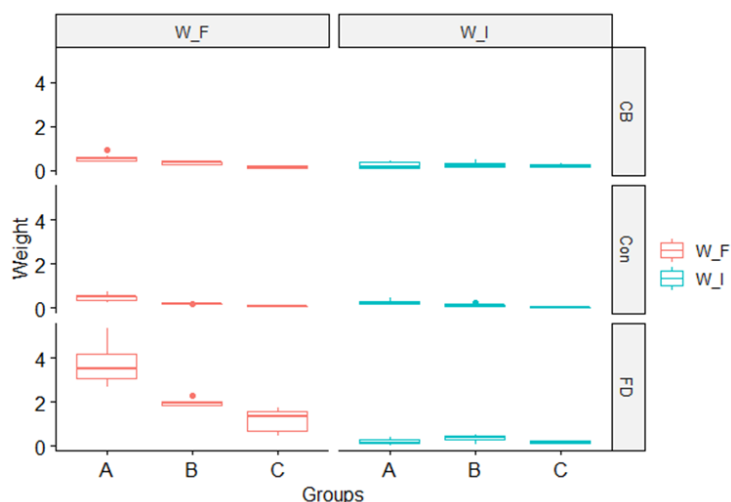
Резултатите от сравнителния експеримент, проведен през 2020 г., показват значителни разлики между вариантите (хидропонни системи СВ и F&D и контрола фитилна система с почва) по отношение на: оцеляване на луковичите, ефективност на растежа и развитието на корените (Фиг. 5). Растежът на луковичите е значително ускорен при F&D поради благоприятните условия за развитие на кореновата система в перлит (до 20 cm дължина), препоръчан от Giurgiu et al. (2014). Повечето луковичи на система СВ са с къси корени под 1 cm или губят корените си, а тези в контролния вариант имат 3 до 5 корена с дължина 1 до 10 cm. В резултат, на система F&D оцеляват 91.7% от луковичите, на система СВ – 79.2% и в контролния вариант – 70.8 %, а в периода на адаптация преимуществата на F&D се открояват още по-ясно: 87.5% от луковичите в този вариант продължават своя растеж и развитие, докато в контролния и в СВ този процент е съответно 45.8% и 41.7%. Рядко се образуват нови луковичи: 4 при система F&D, 1 при система СВ и нито една при контролния вариант.

Статистически е потвърдена липсата на корелация между началното и крайното тегло на луковичите (всички коефициенти на корелация са незначими). Подобно на

експеримента през 2016 г., класифицирането чрез ABC анализ на стойностите според крайното тегло на луковичите води до формиране на 3 неприпокриващи се групи: „високи“ – А, „средни“ – В и „ниски“ – С (Фиг. 6). Vox-plot диаграмите показват, че началните тегла на луковичите са идентични или много сходни и при трите варианта. Както при контролния вариант, така и при система СВ, стойностите на крайните тегла остават почти непроменени, докато на система F&D се наблюдава ясно разделяне на ABC-групите. Това доказва, че стойностите на крайните тегла на луковичите не зависят от стойностите от началните им тегла. Най-добри резултати са получени в група А на хидропонна система F&D, където те увеличават теглото си над 21 пъти за 8 месеца (Табл. 3). Ефективността на растеж на група А е 3 пъти по-висока от тази на група С, като единствената разлика между луковичите от двете групи е в корените им в началото на експеримента. Хидропонна система F&D е избрана като подходяща за ускоряване на растежа на получените *in vitro* луковичи *L. rhodopaeum*.



Фиг. 5. Хидропоника, експерименти през 2020 г.: а) Начални *in vitro* луковички; б) и с) Растения, отглеждани на хидропонната система F&D; д) Растения, отглеждани на хидропонна система СВ; е) и ф) Растения, отглеждани в контролния вариант.



Фиг. 6. Растеж на луковичите при двете хидропонни системи и при контролния вариант, през 2020 г. (W_I –Начално тегло; W_F – Крайно тегло; А, В и С – групи, получени чрез ABC анализ; СВ – Cutting Board; Con – Контролен вариант; FD – Flood & Drain система)

Адаптиране към оранжерия и аклиматизация на открито. Всички оцелели луковици са засадени в почвена смес (Light mix, кокос и пясък в съотношение 2:1:1) и постепенно адаптирани към условия на открито. Този субстрат се оказва много добър за *L. rhodopaeum*, както и при други видове като *Alchemilla mollis* и *Centaurea davidovii* (Stanilova et al. 2012; Gorgorov et al. 2015). Сместа от трите компонента изглежда много подходяща за укрепване на деликатните растения, тъй като кокосовите влакна задържат водата, пясъкът осигурява дренирането на водата, а Light mix осигурява минерали, необходими за растежа им. Двадесет и четири растения от 27 от първия експеримент на хидропонната система СВ, с добре развити листа и цветоносни стъбла, са адаптирани към оранжерийни условия, а 18 от тях са прехвърлени в *ex situ* колекцията на ИБЕИ в София през юни 2018 г., където 12 индивида успешно се аклиматизират и презимуват, а 10 от тях дават началото на допълнително растение (Фиг. 7). В продължение на 2 години добре развитите луковици нарастват, образуват множество листа, достигат до диаметър 3 cm и цветоносно стъбло с височина от 7 до 12 cm. Половината от растенията цъфтят в началото на юни 2021 г. Останалите 6 индивида са засадени в *ex situ* колекцията на Витоша на 1450 m надм. в., през август 2018 г., но не оцеляват, най-вероятно поради пониските зимни температури в сравнение с тези в Родопите. Растенията от експеримента през 2020 г. са засадени в същата почвена смес и след презимуване във фитотронно помещение, през пролетта на 2021 г. са прехвърлени в оранжерията на ИБЕИ.

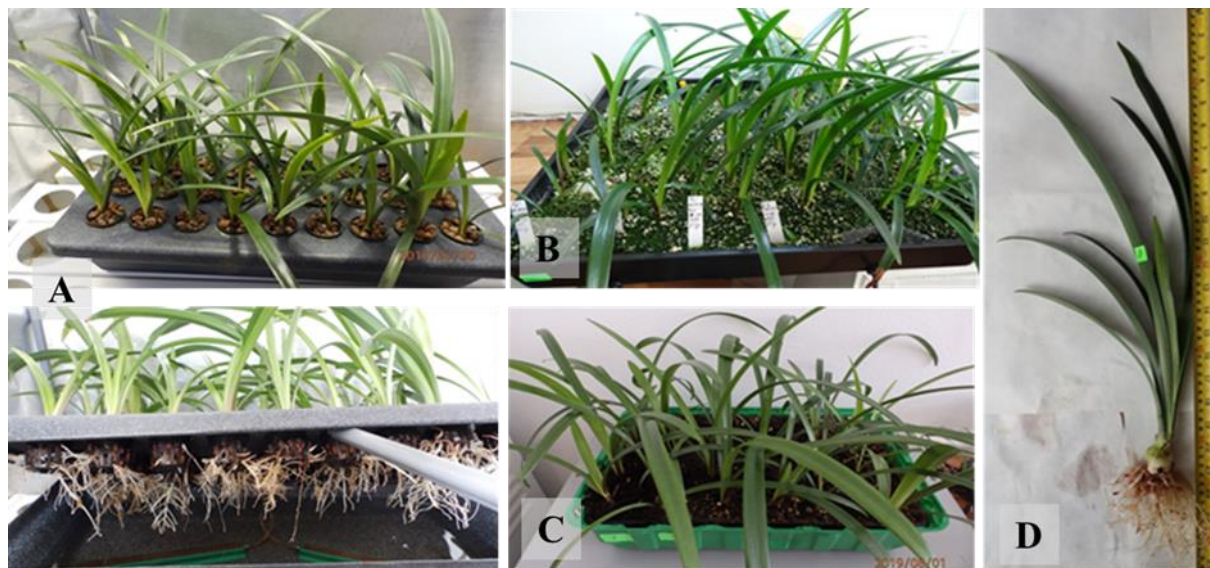


Фиг. 7. Аклиматизация на открито на *L. rhodopaeum*: а) Аклиматизирано хидропонно растение, образуващо допълнителна луковича на втората година след прехвърлянето му в *ex situ* колекцията на ИБЕИ; б) Растения, прехвърлени в колекцията *ex situ* на Витоша.

5.2.2. Ускоряване растежа на луковици от *Hippeastrum papilio*, получени от семена или *in vitro* размножени, при изпитване на различни хидропонни системи (Cutting Board и Flood & Drain) и субстрати (Публикация № 3)

Проведен е експеримент за ускоряване растежа на семенно получени луковици от *H. papilio* на хидропонни системи СВ и F&D и сравнение с контрола в почва. И в трите варианта растенията развиват жизнена коренова система и нови листа (Фиг. 8). Най-добри резултати са получени при система СВ, със 100% оцелели растения с тегло 27.2 ± 16.1 g и диаметър на луковичата 20.8 ± 4.2 mm, тоест теглото на растенията се увеличава средно 59.1 ± 24.0 пъти, а диаметърът на луковичата 4.0 ± 0.8 пъти (Фиг. 9; табл. 4 и 5). При система F&D оцеляват 85% от растенията, теглото им е 15.4 ± 9.2 g и диаметърът на луковичите е 15.8 ± 3.4 mm. Най-слаб растеж се наблюдава в контролния вариант, с 95% оцелели растения с тегло 7.9 ± 3.3 g и диаметър на луковичата 13.1 ± 2.3 mm. Разликите в растежа на растенията между трите варианта са значителни ($P < 0.001$, Excel ANOVA single factor) (Табл. 4 и 5). Варирането във вариантите се дължи на нееднородния размер на разсада. Подобно, при аеропонно и хидропонно размножаване

на шафран е отбелязано значително увеличение на растежа на луковичите в сравнение с растежа им в почва (Souret, 2000).

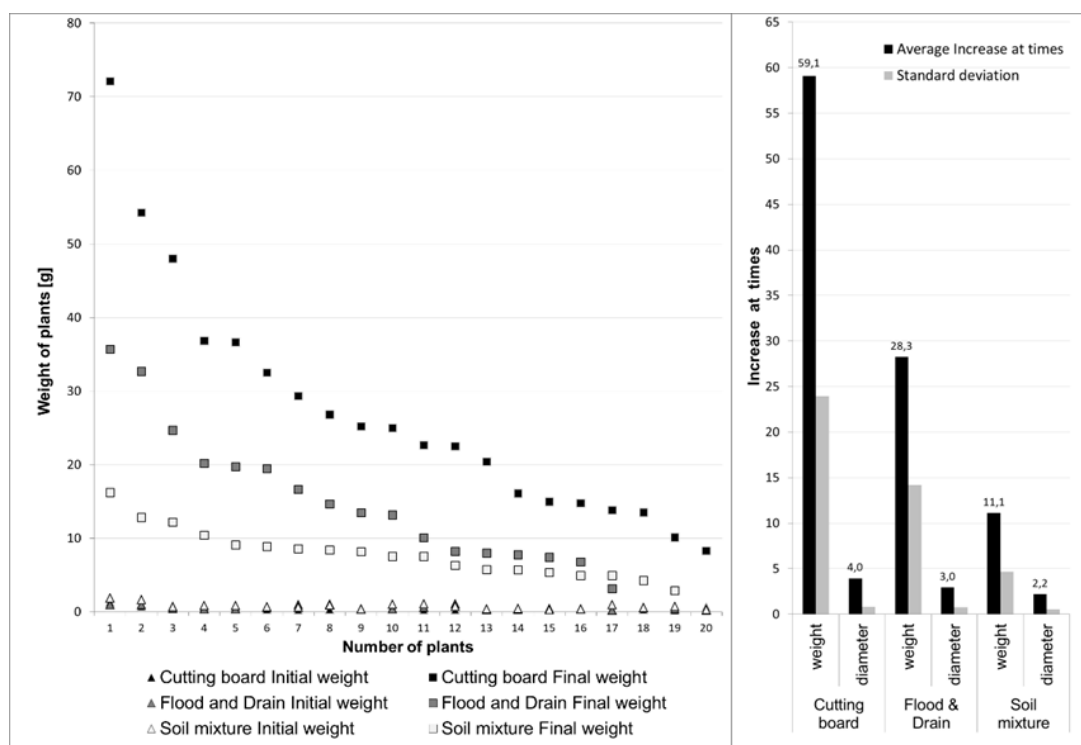


Фиг. 8. Растения след 16 седмици култивиране в 3 тестовни варианта: А) СВ хидропонна система – листа и корени; В) F&D хидропонна система; С) Контрола с почвен субстрат; D) Растение, готово за прехвърляне в почвен субстрат за по-нататъшна адаптация.

Ускоряването на растежа и в двете хидропонни системи в сравнение с контролата се дължи на оптималния баланс на хранителните соли в разтвора в йонна форма (Mugundhan et al., 2011; Texier, 2014). При система СВ корените са потопени в разтвора с постоянна активна аерация, осигурявайки обогатяването му с кислород, което ускорява растежа на растенията и предотвратява замърсяването на разтвора с микроорганизми. Подобен ефект е съобщен за азиатската хибридна лилия св. „Blackrout“, култивирана на хидропонна система NFT, при която корените на растенията поемат оптимални количества хранителни вещества благодарение на обогатения на кислород тънък филм от хранителен разтвор (Asker, 2015).

По време на адаптацията на хидропонно нарасналите растения в почвен субстрат във фитотрон, за 2 месеца се появяват нови листа на растенията от всички варианти.

За нарастване на *in vitro* размножени луковички от *H. papilio* е използвана само система F&D със субстрат перлит. Сравнени са основните параметри на растенията от семенно и *in vitro* получени луковичи при хидропонно култивиране за 16 седмици на F&D, в т.ч. първоначалните и крайните стойности на теглото на растенията и диаметъра на луковичите им (табл. 6). Скоростта на растежа, изчислен чрез растежен индекс (GI_W за теглото и GI_D за диаметъра) е по-ниска при *in vitro* размножените луковичи: $P < 0.001$ (табл. 7 и 8), което вероятно се дължи на по-слабите им корени. Те обаче успешно се адаптират към система F&D, 90.9% от тях оцеляват и развиват по-жизнени корени. Въпреки по-малкия размер на растенията, получени от *in vitro* луковичи, препоръчва се въвеждане на *in vitro* размножаване на *H. papilio* като първа стъпка, за бързо увеличаване на броя на луковичите, поради ограничения брой налични семена от този застрашен и защитен вид. Целесъобразно е прилагането на хидропонно отглеждане на *in vitro* размножените растения като втора стъпка, за ускоряване на тяхното нарастване.



Фиг. 9. Растеж на разсад за 16 седмици: А) Начално и крайно тегло на растенията в трите варианта; В) Увеличаване на растежа в пъти.

Табл. 4. Сравнение на увеличението на теглото на растенията в трите варианта.

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Cutting board	20	79,03333	3,951667	0,683629
Flood and Drain	17	50,18571	2,952101	0,570105
Control	19	42,11548	2,216604	0,304067

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	29,61431	2	14,80716	28,4507	4,04E-09	3,171626
Within Groups	27,58383	53	0,52045			
Total	57,19814	55				

Табл. 5. Сравнение на увеличението на диаметъра на луковичите в трите варианта.

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Cutting board	20	1182,089	59,10444	574,2779
Flood and Drain	17	480,2816	28,25186	201,4541
Control	19	211,0439	11,10758	21,73135

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	23106,85	2	11553,43	42,15501	1,11E-11	3,171626
Within Groups	14525,71	53	274,07			
Total	37632,56	55				

Табл. 6. Основни параметри на получените растения от семенно и *in vitro* размножени луковици на система F&D за 16 седмици.

Plants	<i>In vitro</i> obtained plants		Seed-derived plants	
Parameters	Weight [g]	Bulb diameter [mm]	Weight [g]	Bulb diameter [mm]
Initial values	1.94 ± 1.34	8.62 ± 2.09	0.58 ± 0.29	5.59 ± 1.46
Final values	5.35 ± 3.30	11.40 ± 2.30	15.39 ± 9.17	15.76 ± 3.36

Табл. 7. Темп на растеж на семенно получени и *in vitro* размножени луковици, представен чрез тегловен растежен индекс на растенията (GI_W).

Groups	Count	Sum	Average	Variance
GI_W seed-derived	17	463,2816	27,25186	201,4541
GI_W <i>in vitro</i> obtained	30	64,41876	2,147292	4,22048

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	6838,768	1	6838,768	91,98323	1,89E-12	4,056612
Within Groups	3345,659	45	74,34798			
Total	10184,43	46				

Табл. 8. Темп на растеж на семенно получени и *in vitro* размножени луковици, представен чрез индекса на растеж на диаметъра на луковиците (GI_D).

Groups	Count	Sum	Average	Variance
GI_D seed-derived	17	33,18571	1,952101	0,570105
GI_D <i>in vitro</i> obtained	30	12,04495	0,401498	0,264631

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	26,08996	1	26,08996	69,90056	1,04E-10	4,056612
Within Groups	16,79597	45	0,373244			
Total	42,88593	46				

5.3. Изследване на възможностите за семенно размножаване на целеви видове при хидропонно култивиране

5.3.1. Опити за размножаване на *Haberlea rhodopensis* от семена, на хидропонна система Cutting Board (Публикация № 1)

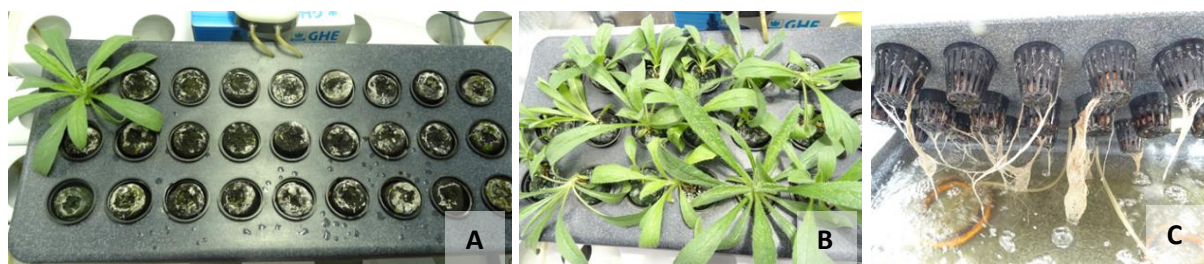
Семената от *H. rhodopensis*, засети върху субстрат торфени кубчета (няколко десетки миниатюрни семена на кубче) на система СВ започват да покълват след 2 седмици. В края на първия месец множество семена покълват и образуват малки котиледони в 23 от общо 27 кубчета. Те нарастват много бавно и в края на третият месец образуват розетки с диаметър около 5 mm, състоящи се от 4 до 6 листа. Торфеният субстрат се оказва неподходящ, тъй като на повърхността на кубчетата се развиват мъхове и гъби, причиняващи гниене на част от розетките, а третирането с биофунгицид има само временен ефект. В края на петия месец най-големите розетки, 30 на брой, са прехвърлени в терина с почвена смес и перлит в съотношение 1:1, но 2 месеца по-късно оцелява само една розетка, която след още 6 месеца достига 4 cm в

диаметър и растежът ѝ е изключително бавен. В контролата от навлажнени кубчета от кокосови влакна покълват много малко от засетите семена, но нарастват само до фаза котиледони и в рамките на няколко месеца умират.

Bogacheva-Milkoteva et al. (2013) също съобщават за лесно покълване на семена от *H. rhodopensis* (върху мокра филтърна хартия в петриев бляда), но само 1% от розетките оцеляват и растежът им е изключително бавен: поничи в стадий котиледони с дължина под 4 mm за 5 месеца. Има данни и за покълване на семена от *H. rhodopensis in vitro* (Djilianov et al., 2005) и размножаване на розетки чрез директна органогенеза, като за около 7 месеца са получени напълно развити *in vitro* растения. Изградена е и стратегия за опазване на *H. rhodopensis*, включваща *in vitro* размножаване като инструмент за производство на множество растения, предназначени за подсилване на естествените популации (Daskalova et al., 2011a, 2011b). До момента обаче няма публикувани резултати за успешно размножаване на вида, най-вероятно поради трудната *ex vitro* адаптация на растенията и много бавния им растеж.

5.3.2. Размножаване на *Alkanna tinctoria* от семена и поничи на хидропонна система Cutting Board (Публикация № 5)

Кълняемостта на семена от *A. tinctoria* без стимулация при лабораторни условия (*in vivo* и *in vitro*) и в почва е много ниска, под 1%. На хидропонна система СВ, от всичките 135 семена от 4 популации, покълна само едно семе от популация Микрево (Фиг. 10-А). За изключително ниска кълняемост на семена от *A. tinctoria* (51 поничи от 925 семена) съобщават и Веџárová et al. (2012), ниска кълняемост е характерна за цялото семейство Boreginaceae (Gerardi et al., 1998), а при *A. orientalis* е доказана латентност на семената (Moustafa, 2002).

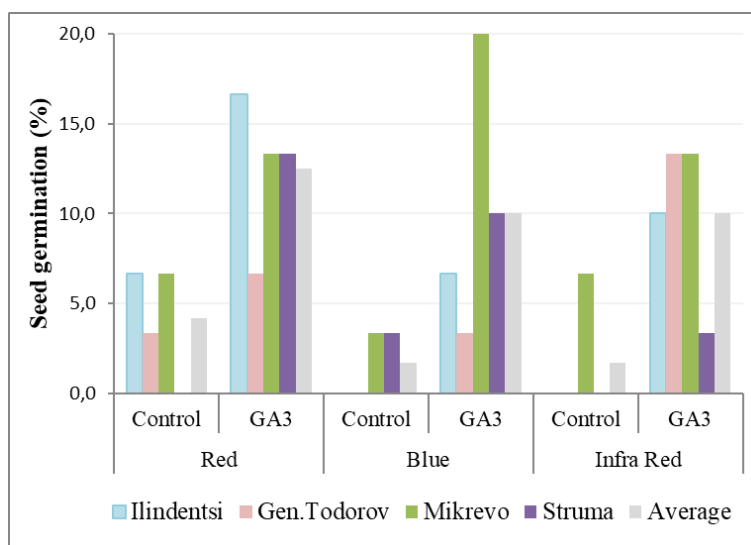


Фиг. 10. Култивиране на *A. tinctoria* на система СВ: А) Покълване на семена; В) и С) Развитие на поничи от *A. tinctoria* на система СВ: изглед отгоре и отдолу.

Кълняемостта на семената е повишена чрез стимулиране с GA_3 и монохроматична светлина, като е отчетено и влиянието на произхода им. Във всички тествани популации покълването започва в края на първата седмица, първо във вариантите с GA_3 и продължава до края на третата седмица. Кълняемостта се повишава главно от GA_3 ($p < 0.001$, Excel t-test paired). Най-добри резултати се наблюдават при семена от популация Микрево, третирани с GA_3 и облъчени със синя светлина: 20% от 30 семена покълват (Фиг. 11). Стимулиращият ефект на GA_3 върху кълняемостта на семената на *A. tinctoria* (до 50%) е съобщен и от Pluhar et al. (2001).

Според кълняемостта, вариантите са групирани в 3 групи (Фиг. 12). При 6 варианта на контролните семена, от 3 популации, изобщо не се наблюдава покълване. Детайлен анализ разкрива връзка между произхода на семената и кълняемостта (Табл. 9). Популацията при с. Микрево е единствената с покълнали семена във всички тествани варианти, а тези в близост до селата Генерал Тодоров и Струма са с най-лош потенциал за кълняемост. Това може да е генетично обусловено и допълнително

повлияно от някои разлики в условията на околната среда: характеристики на почвата, експозиция на местообитанията и микроклимат.



Фиг. 11. Покълване на семената във всички тествани варианти.

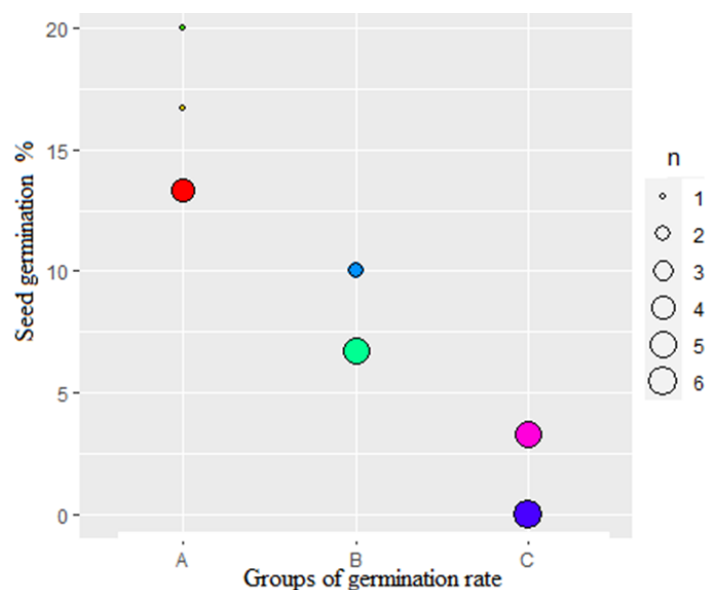
Табл. 9. Връзка между популацията и кълняемостта на семената: групи с относително висока (A), средна (B) и ниска (C) кълняемост.

Population	Number of participation in the ABC-groups		
	A	B	C
Mikrevo	3	2	1
Ilindentsi	1	3	2
Gen.Todorov	1	1	4
Struma	1	1	4

И трите тествани фактора: GA₃ (качество на светлината и произход на семената) повлияват кълняемостта; освен това се наблюдава и взаимодействие на факторите. Така червената светлина е най-добра за семената от популациите Илинденци и Струма, синята светлина – за семената от Микрево, а инфрачервената – за тези от Ген. Тодоров. Ефектът от различни монохроматични светлини върху покълването на семена е съобщен и при други видове, като той може да е специфичен и стимулиращ или инхибиращ (Costa et al., 2016; Nasrullah, 2001; Strydom et al., 2017).

Получените поници са поставени в епруветки с навлажнен перлит и осветявани с луминесцентна светлина 16/8 ч., докато достигнат размерите на разсад, след което са прехвърлени на хидропонна система СВ за допълнително ускоряване на растежа им. При 82% от растенията растежът им се ускорява благодарение на добре развития аксиален корен и множеството коренови разклонения (Фиг. 10-B, C). Растенията са адаптирани успешно към почвения субстрат в саксии и след 2 месеца във фитотронно помещение са прехвърлени за един месец в оранжерията, където укрепват, образуват разклонени стъбла и най-големите започват да цъфтят. В средата на май 27 растения са прехвърлени на открито, в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, където в края на май 2020 г. са наблюдавани първите цъфтящи индивиди. Резултатите показват предимствата на хидропонните технологии при размножаване на *A. tinctoria*: целият цикъл от засяването до цъфтежа на открито отнема 6 месеца, докато в експеримента, проведен от Vešárová et al., (2012) цъфтящи растения са получени след цяла година. Обикновено при прилагане

на хидропонни технологии за ускоряване растежа на растения като изходен материал се използват семена или резници (Texier, 2013), но при *A. tinctoria* пониците се оказват единствения подходящ изходен материал.



Фиг. 12. Групи от варианти с относително висока (А), средна (В) и ниска (В) кълняемост. (Забележка: n показва броя на вариантите с еднакви стойности; размерът на кръга съответства на броя на вариантите с еднакви стойности, по отношение на всички тествани популации)

5.3.3. Семенно размножаване на *Salvia officinalis* на аеро-хидропонна вертикална система Green Diamond (Публикация № 4)

Семената в контролния вариант в почва поникват за 3 седмици, а тези на аеро-хидропонната система GD за 2 седмици. Полученият разсад на система GD на 5-седмична възраст е с височина около 10-15 cm и с добре развити корени (Фиг. 13), като е стимулирано и развитието на силна коренова система и разклонение на стъблата. Растежът на разсада е ускорен: на 3 месечна възраст средната височина на растенията е 23.9 ± 2.5 cm и около $\frac{1}{4}$ от всички 80 растения са образували разклонения от втори порядък (Табл. 10).



Фиг. 13. Вертикална аеро-хидропонна система Green Diamond (GHE) с 5-седмичен разсад на *S. officinalis*.

Табл. 10. Характеристики на разсада към момента на пренасянето му в саксии със стерилизиран компост и универсална почва, 80 растения на група (юли 2015 г.).

Plants	Age of seedlings	*Stem length [cm]	Ramification: first rank (FR) and second rank (SR) shoot branches			Root length [cm]
			Number of FR branches	Number of plants with SR branches	Total number of SR branches	
Conventionally grown	7 months	31.6 ± 3.8	8.8 ± 1.9	15 of 80	134	no data
Hydroponically grown	3 months	23.9 ± 2.5	7.8 ± 0.6	19 of 80	140	12.6 ± 1.7

*статистически доказана разлика $P < 0.001$ (Excel ANOVA single factor)

Сравнителното измерване в началото на юли 2015 г. показва, че 7-месечните растения, отглеждани в почва, са значително по-високи от 3-месечните получени хидропонно ($P < 0.001$), но разклоняването на стъблата и при двете групи е сходно. Всички растения се развиват добре на опитните площи към оранжерията на ИБЕИ (Фиг. 14). Разликите в разклоненията се запазват една година по-късно (Табл. 11). Всичките 36 растения, получени хидропонно, цъфтят, докато 11.1% от почвено отгледаните растения не образуват цветове през първата година. Две от хидропонно получените растения загиват по време на зимуването. Цъфтежът на хидропонно получените растения е много по-изразен, броят на генеративните издънки е значително по-висок ($p < 0.05$), броят на разклоненията и листата е по-голям, което води до увеличение на свежата биомаса с 18.4%. През следващата година всички растения увеличават значително размера си и по време на пълния цъфтеж през май 2017 г. средното свежо тегло на растенията е 1373 ± 655 g (Фиг. 15).

Табл. 11. Характеристики на растенията във фаза на пълен цъфтеж, при контролирано отглеждане в опитното поле, 36 растения на група (началото на юни 2016 г.).

Plants grown	Fresh Weighth [g]	Dry Substance %	Average number of shoots, branches, and leaves per Plant				
			Vegetative shoots	Generative shoots*	% of generative shoots*	Branches	Leaves
Conven- tionally	271±113	22.5±1.8	51.7±20.3	22.4±15.9	25.3±21.6	253±136	750±222
Hydro-po- nically	321±224	23.6±2.6	48.6±45.1	45.9±38.3	49.6±26.2	293±218	938±568

*статистически доказана разлика $p < 0.05$ (Excel ANOVA single factor)



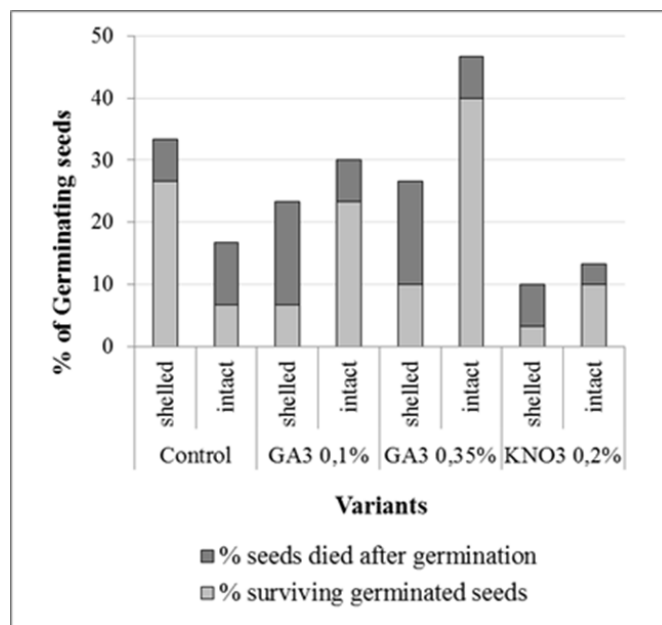
Фиг. 14. Общ изглед на експериментални растения *S. officinalis* (вляво – отглеждани в почва; вдясно – хидропонно получени).



Фиг. 15. Конвенционално (вляво) и хидропонно (вдясно) получени растения, по време на пълен цъфтеж, през втората им година на опитното поле.

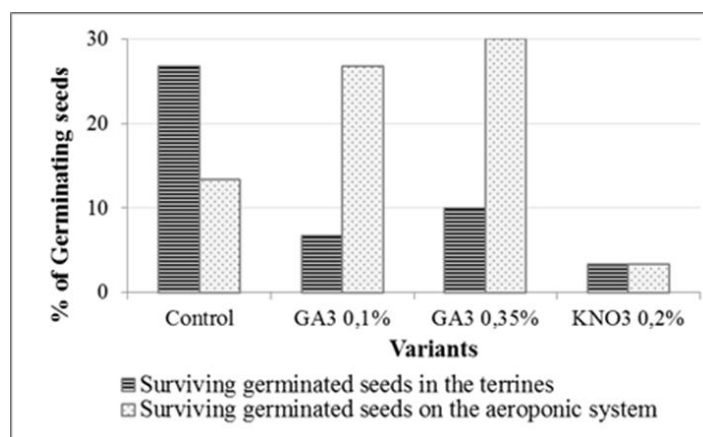
5.3.4. Семенно размножаване на *Echinacea purpurea* на аеро-хидропонна вертикална система Green Diamond (Публикация № 7)

Покълването на семената в терини с почвена смес започва през втората седмица и продължава до края на третата. Едномесечните разсади достигат височина от 2 до 6 cm и имат един или повече същински листа. При контролния вариант обелените семена започват да покълват 3 дни преди небелените. Във всички варианти се забелязва загиване на семена веднага след покълването им или няколко дни по-късно, като общият процент на отпадналите покълнали семена достига 36.7% (в контролата са 33.3%). Ефектът на стимулиращите агенти изглежда токсичен за обелените семена в приложените концентрации, причинявайки некроза на 66.7% от зародишите в тези варианти срещу 18.5% за небелените семена в същите варианти (Фиг. 16). Доказано е, че взаимодействието между наличието на обвивка на семената и ефекта на стимулиращите агенти е значимо по отношение на оцелелите семена ($p = 0.02$, Excel ANOVA Two-factor with Replication). Отстраняването на дебелата обвивка на семената води до значително по-висока кълняемост при контролния вариант: 33.3% срещу 16.7% за небелените семена. Най-добри резултати се получават при варианта с небелени семена, накиснати в 0.35% GA_3 , където 46% от семената покълват в терина, а 40% оцеляват (Фиг. 16).



Фиг. 16. Кълняемост на небелени и обелени семена в терини с почвена смес (контролен и стимулирани варианти)

При аеро-хидропонната система GD покълването на семената започва на шестия ден и продължава 2 седмици. Няма загинали зародиши с изключение на семената, третирани с високата концентрация на GA_3 , където 1/3 от зародишите некротизираха. Оцеляването на покълналите семена вероятно се дължи на разтвора, който редовно промива семената. Влиянието на стимулиращите агенти (GA_3 и KNO_3) върху кълняемостта на обелените семена зависи от използвания метод: терини с почвен субстрат или аеро-хидропонна система ($p = 0.03$, Excel ANOVA Two-factor with Replication). При стимулираните семена най-добри резултати се получават във вариантите, третирани с GA_3 на система GD – 26.7% здрави покълнали семена във вариант GA_3 0.1% и 30.0% във вариант GA_3 0.35%, докато контролният вариант е по-добър при терините (Фиг. 17).



Фиг. 17. Процент на оцелелите покълнали обелени семена в терините и в аеро-хидропонната система GD

Разсадът, отгледан на система GD, образува добре развити листни розетки и корени, чиято дължина е 13.2 ± 5.6 cm 10 седмици след началото на експеримента (Фиг. 18-A, B). Растенията са постепенно адаптирани в саксии с почвена смес във фитотронно помещение за 1 месец и още 1 месец в оранжерия, след което са аклиматизирани в *ex*

situ колекцията на ИБЕИ на открито. Разсадът на аеро-хидропонната система нараства два пъти по-бързо спрямо този в почвата, най-вероятно поради бързото развитие на техните корени. Получени са растителни розетки с еднакъв размер за 9 месеца чрез директно засяване в почвата и за 4.5 месеца, когато е използвана аеро-хидропонната система. Повечето растения не цъфтят през първия сезон, но някои индивиди цъфтят само 3 месеца след прехвърлянето им в *ex situ* колекцията на ИБЕИ. По време на третата си пролет на открито през 2017 г. много растения развиват по няколко цвята, до 4 цвята при отглежданите на аеро-хидропонната система (Фиг. 18-С).



Фиг. 18. Хидропонно отгледани растения от *E. purpurea*: А) и В) Разсад на 10 седмици, получен на система GD; С) Аклиматизирани растения, получени чрез директна сеитба в почва (вляво) и чрез покълване на система GD (вдясно), през третата им пролет.

Публикуваните данни относно кълняемостта на семената на видове от род *Echinacea* са противоречиви: някои автори съобщават, че кълняемостта е трудна и варира между 2 и 50 % (King, 2005), докато други съобщават за висока кълняемост до 92 % (Evstatieva et al., 1993). Въпреки съхранението на семената в хладилен шкаф през зимата, прилагането на температурен стрес и стимулиращи агенти преди експериментите, нашите резултати не надвишиха 46% покълване. За приложение в практиката най-добре е да се ползват небелени семена, предварително накиснати в 0.35% GA₃. Според Letchamo et al. (2002) добивът на корени от хидропонно отгледани растения е около 2.3 пъти по-висок от средния за северноамериканското полско производство. Други предимства при хидропонното култивиране на ехинацея са лесното почистване на корените поради липсата на пръст, камъни и плевели, минималното микробно замърсяване и запазването на фините корени, съдържащи най-високи количества цикориева киселина. Въпреки бавния растеж на младите разсади от *E. angustifolia*, корените на 10-месечни растения, отглеждани в оранжерийна хидропоника, съдържат общи алкамиди в нива, сравними с тези на 3 до 4-годишни растения, отглеждани на полето (King, 2005).

5.4. Сравнителен анализ на резултатите от хроматографско определяне на биологично-активните вещества на хидропонно нараснали растения спрямо контролните

5.4.1. Сравнителен анализ на биологично-активните вещества на хидропонно нараснали и контролни растения при *Salvia officinalis* (Публикация № 4)

Резултатите от направения хроматографски анализ на състава на маслото при *S. officinalis* показват, че средната концентрация на етерични масла в събраните в началото на юни 2016 г. почвено отгледани и хидропонно получени растения е съответно 1.08 и 0.98 % w/v. През втората година всички експериментални растения цъфтят и разликата в

размера им намалява, като средната концентрация на етерични масла е 1.10 и 1.08 % w/v за двете групи. В най-високи концентрации са открити α -туйон и 1,8-цинеол (табл. 12), които, заедно с камфор, са съобщени и от други автори като основни компоненти на маслото от *S. officinalis* (Peshevski et al. 1997; Pop et al. 2013). Освен компонентите в табл. 12, са идентифицирани и други летливи съединения в малки концентрации (р-цимен, кариофилен оксид, борнилацетат и др.).

Табл. 12. Състав на етеричните масла от *S. officinalis* при конвенционално и хидропонно отгледани растения, през първата и втората година от засаждането им в *ex situ* колекцията на ИБЕИ (средни стойности, изчислени за 10 проби в двете групи).

Compound	RT	2016				2017			
		Conventionally grown		Hydroponically grown		Conventionally grown		Hydroponically grown	
		Area %	in plants	Area %	in plants	Area %	in plants	Area %	in plants
α -Pinene	7.08	6.94	10	5.37	7	6.35	10	5.89	9
Camphene	7.47	1.23	10	1.53	10	1.34	9	1.13	10
β -Pinene	8.18	2.65	10	2.33	10	5.11	9	4.63	9
1,8-Cineole	9.62	14.35	10	22.60	10	18.97	9	16.87	9
α -Thujone	11.67	12.93	5	22.25	4	15.50	7	13.03	7
β -Thujone	11.56	8.90	5	22.63	4	14.76	7	24.55	1
(-)-Camphor	12.60	6.13	10	8.49	7	3.87	8	4.08	7
Borneol	13.20	3.43	9	3.34	9	3.75	8	3.21	9
β -Caryophyllene	19.02	7.22	10	8.80	10	8.19	9	9.44	9
α -Caryophyllene	19.84	6.50	9	6.27	10	4.15	8	5.15	8
Unknown	22.68	3.64	7	11.22	10	4.38	4	10.92	10
Manool	23.42	10.09	7	1.19	10	10.74	7	0.89	9
Viridiflorol	30.79	3.33	9	0.00	0	3.71	9	0.00	0

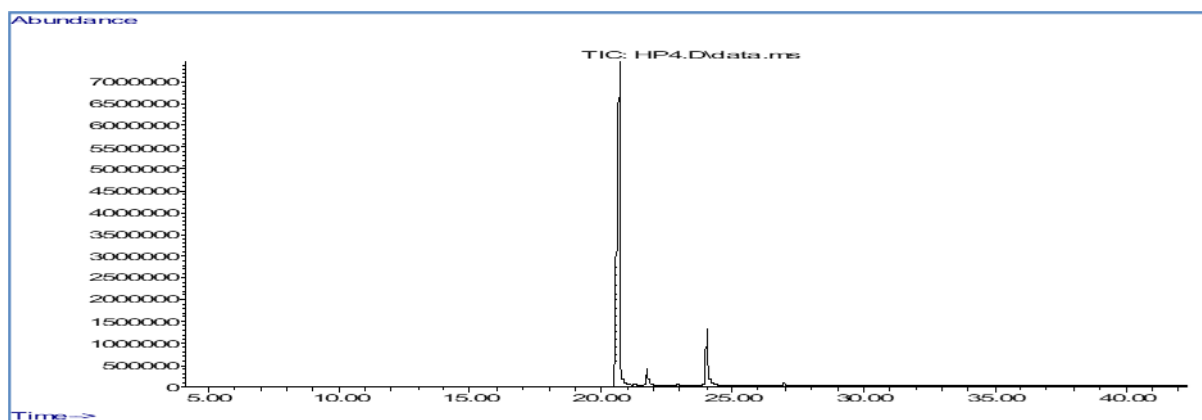
Съдържанието на етерични масла зависи от фенофазата, като максимумът му е във фаза бутонизация до пълен цъфтеж. Сред анализираните индивиди се наблюдава значително вариране в терпеновия модел, което може да се обясни с това, че някои от пробите се състоят от цветни пъпки и цъфнали цветове, докато други – от цъфтящи и прецъфтели цветове. Количеството 1,8-цинеол и α -туйон е по-високо в хидропонно отглежданите растения в пробите, събрани през 2016 г. Сесквитерпенът виридифлорол не е открит в хидропонно отглежданите растения, докато количеството на дитерпеновия манол е значително по-малко в тези растения в сравнение с почвено отглежданите. Тези разлики могат да бъдат свързани със значително по-големия брой генеративни стъбла в хидропонно отглежданите растения, представляващи половината от всички стъбла, докато в почвено отглежданите растения те са два пъти по-малко (табл. 11). В зависимост от предназначението му, етеричното масло от *S. officinalis* се извлича само от листата или от цялата надземна част, поради разнообразие в съдържанието на компонентите. Евстатиева и др. (1997) посочват, че процентът на някои съединения е по-висок през пролетта, а на други - през есента, напр. съдържанието на 1,8-цинеол е много по-високо в цялото растение по време на цъфтежа. Това обяснява разликите в съдържанието на основните компоненти 1,8-цинеол и α -туйон в конвенционално и хидропонно отглежданите растения през първата година, когато генеративните стъбла на хидропонно отглежданите са два пъти повече в сравнение с тези на отглежданите в почва (табл. 12).

5.4.2. Сравнителен анализ на алкалоидния състав и съдържание на галантамин на хидропонно нараснали и контролни растения при *Hippeastrum papilio* (Публ. № 3)

Алкалоидният състав на сборните проби от трите варианта на отгледани растения от *H. papilio* (на хидропонни системи СВ и F&D, и в почва като контрола) е представен в табл. 13. Открити са общо 8 алкалоида в трите варианта. Галантаминът е основният алкалоид в листата на всички проби, около 90% (Фиг. 19). Хемантаминът и нарвединът са с относително високо съдържание, подобно на съобщените по-рано резултати (Berkov et al., 2019). Съдържанието на галантамин в листата на растенията, отглеждани в почвен субстрат, е 0.86% в сухото тегло, докато за пробите от хидропонните системи СВ и F&D то е съответно 0.66% и 0.72%. Съдържанието на галантамин и в трите тествани варианта е съизмеримо с това на местните растения. Свързаните амарилисови алкалоиди остават в много ниски концентрации. Резултатите показват, че растенията поддържат способността си да биосинтезират високи нива на галантамин в хидропонните системи. Подобни концентрации на биоактивни съединения са докладвани и за шафран, отглеждан хидропонно, аеропонно и в почва (Souret, 2000). Като се има предвид, че натрупването на биомаса във варианта на система СВ е 5 пъти по-високо, отколкото в контролния вариант (Фиг. 9), прилагането на хидропонно култивиране би съкратило значително периода, необходим за достигането на фазата на цъфтеж при използването на растенията за рязан цвят или за производство на галантамин.

Табл. 13. Алкалоиден състав в листата от растения, нараснали на двете хидропонни системи (СВ и F&D) и в почвена контрола, определен с GC-MS анализ, и изразен като проценти от общата алкалоидна смес.

Alkaloids in the leaves	Retention time (min)	Control (soil) (%)	CB hydroponics (%)	F&D hydroponics (%)
Apogalanthamine	19.65	0.2	trace	0.1
Galanthamine	20.89	93.5	88.2	91.0
Narwedine	22.00	2.3	3.4	1.2
9-O-Demethyllycosinine	22.14	0.5	0.5	1.8
11 β -Hydroxygalanthamine	23.16	0.2	0.4	1.4
Haemanthamine	24.35	3.2	6.8	4.4
Papilline	27.16	0.1	0.6	0.1
3-O-Demethyl-3-O-(3-hydroxybutanoyl)-haemanthamine	29.20	trace	0.1	trace



Фиг. 19. GC-MS хроматограма на алкалоидна фракция от листа на *H. papilio*.

5.4.3. Сравнителен анализ на биологично-активните вещества на хидропонно нараснали и контролни растения при *T. longedentatus* и *T. zygioides* (Публ. № 6)

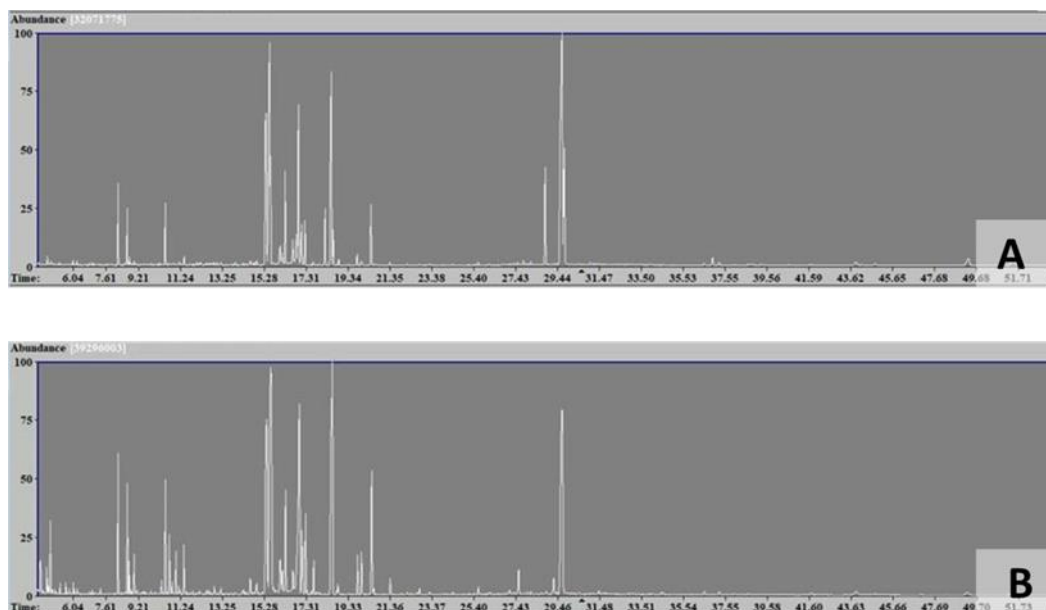
Химичният състав на метаноловите екстракти от *T. longedentatus* и *T. zygioides* е анализиран чрез GC/MS. Като основни компоненти в профилите на изследваните екстракти са открити изомерите тимол и карвакрол, тритерпенови киселини (урсолова и олеанолева) (табл. 14). Идентифицирани са няколко фенолни киселини, сред които най-разпространени са розмаринова, хлорогенова, кафеена, хидроксиканелена и хидроксibenзоена. Идентифицирани са също съединения, отнасящи се до мастни киселини, органични киселини, стероли, полиоли и захарни киселини (хининова). Екстрактът от *T. zygioides* се отличава от този от *T. longedentatus* по високото съдържание на тимол и карвакрол и наличието на специфични съединения като геранова киселина и хидрохинон (Фиг. 20).

Табл. 14. Метаболитни профили на хидропонно отгледани растения от *T. longedentatus* и *T. zygioides*.

Metabolite *	RT	<i>T. longedentatus</i>	<i>T. zygioides</i>
Phenolic acids			
Benzoic acid	8.02	4.2	13.7
4(p)-Hydroxybenzoic acid	12.64	2.2	7.7
Vanilic acid	14.71	3.8	4.1
Protocatechuic acid	15.70	1.0	2.6
Quinic acid	16.30	274.8	774.1
Gentisic acid	17.96	0.2	0.3
Hydroxycinnamic acid <i>trans</i>	18.07	3.0	41.3
Ferulic acid	20.57	1.7	27.2
Caffeic acid	24.74	14.5	21.5
Taxifolin	34.38		2.4
Chlorogenic acid	36.93	72.1	53.5
Rosmarinic acid	44.76	20.8	15.4
Fatty acids			
Octanoic acid	11,83	5.6	80.9
Hexadecanoic acid C16:0	20,01	62.2	297.7
Octadecanoic acid C18:0	23,43	8.1	50.0
Fatty alcohols			
Octadecanol	21.73	0.2	1.5
Monoterpenes			
Thymol	8.67	34.8	473.5
Carvacrol	8.85	18.2	28.7
Hydroquinone	9.54	0.8	
Geranic acid	10.18	14.3	
Sterols and Triterpenes			
Stigmasterol	40.46	15.0	1.8
β -Sitosterol	42.06	8.4	37.5
Oleanolic acid	49.30	79.4	48.9
Ursolic acid	51.47	98.8	132.9
Organic acids			
Succinic acid	8.71	179.2	340.1
Glyceric acid	8.81	8.6	281.7
Malic acid	10.61	290.7	587.2

Polyols			
meso-Erythritol	11.00	8.3	147.7
Myo-Inositol	20.46	195.9	891.6
Saccharides			
Fructose 1	15.38	644.7	604.5
Fructose2	15.58	1083.8	1500.6
Glucose	17.09	580.5	329.8
Sucrose	29.68	1458.2	1239.1

*Стойностите $\pm$ SD (μg) представляват съотношения на отговор, изчислени за всяко съединение спрямо вътрешния стандарт.



Фиг. 20. GC/MS хроматограми на хидропонно отгледани растения: А) *T. longedentatus*; В) *T. zyglroides*.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За успешното прилагане на хидропонните технологии е много важен изборът на подходящ изходен растителен материал, както и на най-добрите за него субстрати и хидропонни системи. Въпреки някои общи насоки в литературата, оптималните условия за всеки растителен вид обикновено се изясняват и конкретизират на основата на сравнителни експерименти. Трябва да се отбележи също, че в много случаи в литературата липсват конкретни данни поради засиления интерес на бизнеса към хидропонните технологии и запазването на ноу-хау за важни от стопанска гледна точка култури.

При повечето изследвани видове, представени в настоящия труд, са създадени протоколи за успешното прилагане на този иновативен метод, в характерните за научните разработки мащаби: лабораторно ниво и *ex situ* колекции. При някои от видовете е експериментирано както със семена, така и с вегетативни органи.

Обектите на изследване са изцяло съобразени с мисията на ИБЕИ и основните направления на работа в отдел РГРР, а именно икономически и социално значими видове: лечебни и ароматни растения с търсене на пазара, повечето с ресурсен дефицит, както и видове с консервационна значимост.

Безпочвеното култивиране на основата на вегетативното размножаване на растенията може да се разглежда като част от растителните биотехнологии и не случайно в някои от представените експерименти е свързано с предхождащ етап на *in vitro* култивиране на видове със затруднено размножаване. Хидропонно размножените или бързо нараснали растения също се нуждаят от адаптация към почвен субстрат и към нормалните климатични условия на околната среда.

Важно е да се определи евентуалното влияние на хидропонния начин на отглеждане върху способността на лечебните и ароматни растения да синтезират биологично-активни вещества. В тази връзка експериментите обикновено се придружават и с определяне на състава и съдържанието на характерните за вида вторични метаболити.

Ex situ колекцията на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания е обогатена с нови видове, размножени чрез прилагане на хидропонни технологии: *Haberlea rhodopensis*, *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus*, *T. zygoides*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Lilium rhodopaeum*, *Alkanna tinctoria*, *Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis*.

6.1. Основни изводи

1) Установени са специфични особености при хидропонно вегетативно размножаване на някои лечебни растителни видове с консервационно значение:

- При всички изпитани целеви видове (*Haberlea rhodopensis*, *Thymus pannonicus*, *T. zygoides* и *T. longedentatus*, *Vaccinium vitis-idaea*) вкореняването и оцеляването на листата или резниците е много по-успешно на хидропонните системи в сравнение с контролата в почвен субстрат, благодарение на по-добре развитата коренова система. Само за няколко месеца хидропонно размножените растения са успешно адаптирани към почвен субстрат при оранжерийни условия.
- При *Haberlea rhodopensis*, при използване на аеро-хидропонни системи, от съществено значение за успеха на размножаването са: видът на субстрата (47% от свежите листа на перлит в агролава на система GD образуват средно по 2.9 добре оформени розетки) и предварителното вкореняване на листата във влажен перлит (на система Aeroflo-20 85% от листата образуват средно по 2.2 добре оформени розетки).
- Отбелязани са специфични особености при трите целеви вида мащерка, по отношение на процента вкоренени и оцелели растения, чувствителността към въздушната влажност и периода на култивиране до достигане на фаза цъфтеж.
- При *Vaccinium vitis-idaea* от определящо значение е възрастта на резниците. Най-добри резултати се постигат при полуудървенели резници, третирани с IBA (100% вкоренели и оцелели) на система F&D със субстрат перлит.
- Третирането с IBA води до подобряване на вкореняването само при *Vaccinium vitis-idaea*, докато при *Haberlea rhodopensis* стимулира образуването на множество миниатюрни розетки в основата на новополученото растение.

2) Хидропонните технологии са подходящи за ускоряване растежа на бавно растящи луковични видове при използване на луковици, получени от семена или размножени *in vitro*.

- Прилагането на хидропонни технологии води до преодоляване на покоя, в който изпадат *in vitro* размножените луковички от *Lilium rhodopaeum* при многократното им субкултивиране на хранителна среда. Оцеляването и нарастването на луковици, пренесени на хидропонна система, зависи от степента на развитие на корените, докато началното им тегло е без значение. Растежът на корените и образуването на

нови коренчета се стимулира от наличието на бактерията *Trichoderma harzianum* в хранителния разтвор.

- За хидропонно култивиране на *in vitro* луковички от *L. rhodopaeum* система F&D със субстрат перлит е по-подходяща от система СВ с торфен субстрат. За 8 месеца луковиците с добре развити коренчета нарастват 22 пъти. По-високите стойности на ЕС на разтвора стимулират и образуването на нови луковички (при СВ, 6 от общо 26 образуват общо 15 нови луковички). Много от адаптираните в почвен субстрат растения при оранжерийни условия образуват цветоносни стъбла още през първия сезон. От поставянето на *in vitro* луковичките на хидропонна система до аклиматизиране на растенията в *ex situ* колекцията и достигане на цъфтеж, са необходими около 2.5 години.
- Нарастването на семенно получени или *in vitro* размножени луковици от *Hippeastrum papilio* е по-ефективно на хидропонна система СВ със субстрат керамзит в сравнение със система F&D със субстрат перлит. За 16 седмици теглото на растенията на система СВ нараства средно 59.1 ± 24.0 пъти, докато при контролата в почва е само 11.1 ± 4.7 пъти.

3) При проблемна кълняемост на семената е необходимо стимулиране на покълването преди или по време на хидропонното култивиране. Установено е значително ускоряване на растежа и развитието на някои целеви видове при култивиране на семена или поници на хидропонни системи.

- Кълняемостта на семената от *Echinacea purpurea* е стимулирана чрез третиране с GA3 (от 16% на 46% след накисване за 1 ч. в 0.35%). Използването на аеро-хидропонна система GD стимулира образуването на добре развита коренова система, което съкращава 2 пъти времето за достигане на зряла възраст, в сравнение с растенията, покълнали в терина с почва.
- При *Salvia officinalis* използването на аеро-хидропонната система GD води до значително ускоряване на растежа и развитието: по-бързо покълване на семената и по-силно разклоняване на стъблото (3-месечни хидропонно отгледани растения се равняват на 7-месечни, почвено отгледани). Разликите се запазват и след аклиматизацията на растенията в *ex situ* колекцията: увеличен добив на биомаса с 18% и образуване на два пъти повече цветоносни стъбла, съответно повишено количество на етеричното масло. Времето от покълването на семената до жътвата е съкратено с 5 месеца.
- Изключително ниската кълняемост на семената при *Alkanna tinctoria* (под 1% при *in vivo*, *in vitro* и на хидропонна система СВ със субстрат торфени кубчета) е преодоляна чрез комбинирано третиране на семената с GA3 и монохроматична светлина (20% покълнали в най-добрия вариант: 0.35% GA3 и синя светлина). Прехвърлянето на пониците на система СВ води до бързото им нарастване и съкращаване на периода от покълването на семената до фаза цъфтеж от 12 на 6 месеца.
- Прилагането на система СВ със субстрат торфени или кокосови кубчета е неподходящо при *Haberlea rhodopensis* поради прекалено бавното нарастване на пониците (1 cm за 5 месеца) и развитието на водорасли, мъх и ларви на вредители върху субстрата.

4) Установено е, че хидропонно култивираните растения от изследваните фитохимично видове запазват способността си да синтезират типичните за тях биологично-активни вещества.

- Галантаминът е основен алкалоид във всички изследвани листни проби от *Hippeastrum papilio*: хидропонно култивирани растения на системи F&D и СВ,

почвено отглеждани контролни растения и растения от естествените находища (около 90% от общото алкалоидно съдържание). Във всички проби съпътстващите 7 алкалоида са едни и същи.

- Установена е обратна пропорционалност между растежа на биомасата на *H. papilio* и съдържанието на галантамин в нея, като то е най-високо в листата на растенията, отглеждани в почвен субстрат: 0.86% в сухото тегло, докато в тези от хидропонните системи СВ и F&D е съответно 0.66% и 0.72%. Слабото намаляване на съдържанието на галантамин на система СВ се компенсира от интензивния растеж и биомасата (5 пъти повече отколкото при почвено култивираните растения).
- Концентрацията на етерични масла в конвенционално и хидропонно получените растения от *Salvia officinalis*, определена през първата и втората година на култивирането им в ex situ колекцията, не се различава и е около 1 – 1.1% w/v.
- Хидропонното култивиране на *S. officinalis* влияе върху състава на етеричното масло и количеството на компонентите му (в хидропонно отгледаните растения сескитерпенът виридифлорол липсва, количеството на 1,8-цинеол и α -туйон е по-високо, а това на дитерпена манол е значително по-малко). Разликите в количеството на етеричното масло се запазват и през втората година, което се дължи на значително по-големия брой генеративни стъбла, образувани при хидропонно получените растения.
- Метаболитните профили на хидропонно отгледаните растения от изследваните видове мащерки съответстват на тези на родителските растения. Метанолният екстракт от *T. zygioides* се различава от този на *T. longedentatus* по високото съдържание на тимол и карвакрол и наличието на някои специфични съединения като геранова киселина и хидрохинон.

7. ПРИНОСИ

1) За първи път са получени растения от *Haberlea rhodopensis* чрез хидропонно размножаване, с използване на листа, на две различни аеро-хидропонни системи: вертикалната Green Diamond (най-добри резултати) и хоризонталната AeroFlo-20. Броят на образуваните наченки на нови розетки в основата на листа и на добре оформени розетки до 10 cm в диаметър, зависи от условията на хидропонно култивиране (субстрат и третиране с ИВА). Няколкогодишните наблюдения (след публикуването на представената статия) показват бавен, но стабилен растеж на розетките в оранжерията, образуване на клъстери вследствие нарастването на малките розетки и цъфтеж в три поредни години, доказващ устойчива аклиматизация и надеждност на метода.

2) За първи път са получени растения от 3 вида мащерка (*Thymus pannonicus*, *T. zygioides* и Балканския ендемит *T. longedentatus*) чрез вегетативно размножаване от резници, с прилагане на хидропонни технологии. Методът е много подходящ при изпитаните видове, предвид трудното и бавно вкореняване на резниците в почвен субстрат. Установени са видови различия, свързани с процента на вкоренените и оцелели растения, необходимото време за достигане на цъфтеж в условията на хидропонно култивиране и чувствителността към въздушната влажност, респ. към брашнеста мана.

3) Създадени са протоколи за размножаване на лечебни и консервационно значими растителни видове с прилагане на хидропонни технологии на лабораторно ниво чрез: вегетативно размножаване (*Haberlea rhodopensis*, *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus*, *T. zygioides* и *Vaccinium vitis-idaea*) и семенно размножаване (*Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis*, *Alkanna tinctoria*).

4) Подобрен е протоколът за ускорено *in vitro* размножаване на луковични видове с бавен растеж (*Lilium rhodopaeum* и *Hippeastrum papilio*) чрез надграждане с нова стъпка: прилагане на хидропонно култивиране на *in vitro* получените луковици за ускоряване на нарастването им. Ефектът от добавянето на тази технологична стъпка се изразява както в съкращаване на времето от въвеждането на вида в *in vitro* култура до адаптацията на растенията към оранжерийни условия и контролирано култивиране на открито, така и в увеличаване на процента на успешно аклиматизирани растения. По този начин са преодолените трудностите, свързани с дългосрочното *in vitro* култивиране на тези два вида.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Traykova B., Stanilova M.** (2020). Soilless propagation of *Haberlea rhodopensis* Friv. using different hydroponic systems and substrata. *Ecologia Balkanica*, 12(1): 111-121. (SJR 0.144, Q4) Available at: http://web.uniplovdiv.bg/mollov/EB/2020_vol12_iss1/111-121_eb.20107.pdf
- Traykova B., Molle E., Stanilova M.** (2022). Multiplication of *Lilium rhodopaeum* Delip. in laboratory conditions and growth acceleration using hydroponic technologies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 58(2): 200-212. Print ISSN 1054-5476, (IF 2.60, Q2; SJR 0.472, Q2) <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10231-y>
- Traykova B., Berkov S., Stanilova M.** (2024). Growth acceleration and galanthamine content of *Hippeastrum papilio* plants grown on hydroponic systems. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 13(6): e9247. ISSN 13385178, (SJR 0.234 for 2023, Q3) <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9247>
- Traykova B., Stanilova M., Nikolova M., Berkov S.** (2019). Growth and essential oils of *Salvia officinalis* plants derived from conventional or aeroponic produced seedlings. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 84(1): 77-81, ISSN 1331-7776, (SJR 0.164, Q3) Available at: <https://hrcak.srce.hr/file/319000>
- Traykova B., Grigorova I., Stanilova M., Molle E., Yankova-Tsvetkova E.** (2020). *Alkanna tinctoria*: an approach toward ex situ cultivation. *Ecologia Balkanica*, SE, 3: 107-115. Online ISSN 1313-9940; Print ISSN 1314-0213. (SJR 0.144, Q4) Available at: http://web.uni-plovdiv.bg/mollov/EB/2020_SE3/107-115_eb.20SE303.pdf
- Traykova B., Nikolova M., Stanilova M., Aneva I.** (2024). Growth and GC/MS based metabolic profile of the hydroponically propagated species of genus *Thymus* (Lamiaceae). *Phytologia Balcanica*, 30(1): 85-94. ISSN 1310-7771 (print), 1314-0027 (online). <https://doi.org/10.7546/PhB.30.1.2024.8>
- Traykova B., Stanilova M.** (2018). Enhancement of seed germination and growth of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Proceedings of 10th Anniversary Seminar of Ecology with International Participation - 2017*, 88-96. ISBN: 979-853-476-132-4. https://0d04ede3-6043-473f-8e2a-bd61bdb5c10f.filesusr.com/ugd/16129b_9b84e1751d9d480d8b786237053baefd.pdf
- Stanilova M., Traykova B., Mincheva I., Yankova-Tsvetkova E.** (2022). Soilless propagation of wild Ericaceae medicinal shrubs, *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 68 (Suppl 2) 213-214. Online ISSN 1857-8969, <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.04.098>

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С РЕЗУЛТАТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Traykova B.**, Berkov S. & Stanilova M. (2019). „Enhancement of *Hippeastrum papilio* growth using hydroponic systems”. In: Youth Scientific Conference “Kliment’s Days”, 08 November, Sofia, at the FB of SU “Kliment Ohridsky”, poster. Program and abstracts, p. 57
2. **Traykova B.**, Stanilova M. (2017). “Enhancement of seed germination and growth of *Echinacea purpurea* (Asteraceae)”. In: Seminar of Ecology- with international participation, 27 – 28 April, Sofia, IBER – BAS, poster. Program and abstracts, p. 42
3. **Traykova B.**, Stanilova M. (2018). “Hydroponic approach for seed propagation of *Haberlea rhodopensis* Friv. (Gesneriaceae)”. In: Seminar of Ecology- with international participation, 26 – 27 April, Sofia, IBER – BAS, poster. Program and abstracts, p. 24
4. **Traykova B.**, Stanilova M., Nikolova M. & Berkov S. (2018). “Growth and essential oils of *Salvia officinalis* plants derived from conventional or aeroponic produced seedlings”. In: 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 20-24 May, Split, Croatia, poster. Program and abstracts, p. 196
5. **Traykova B.**, Stanilova M. (2018). “Rooting of leaves of *Haberlea rhodopensis* Friv. (Gesneriaceae) using a vertical aeroponic system”. In: 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 20-24 May, Split, Croatia, poster. Program and abstracts, p. 197
6. **Traykova B.**, Grigorova I., Stanilova M., Molle E. & Yankova-Tsvetkova E. (2020). „*Alkanna tinctoria*: an approach toward ex situ cultivation“. In: Seminar of Ecology (with International Participation), 23 -24 April, Sofia, IBER – BAS, poster. Program and abstracts, p. 32
7. **Traykova B.**, Stanilova M. (2020). „Multiplication and growth acceleration of *Lilium rhodopaeum* Delip. using in vitro and hydroponic technologies“. In: International Scientific Conference on Restoration of Conservation-Reliant species and habitats, 06 November, Sofia, at the FB of SU “Kliment Ohridsky”, poster. Program and abstracts, pp. 25–26
8. **Traykova B.**, Stanilova M. & Aneva I. (2021). Soilless cultivation of three species of genus *Thymus* (Lamiaceae). In: Europe International Conference “Pathways to extend sustainable water reuse practices in Europe” (in the frame of the project SUWANU Europe), 18-19 May, online, poster. <https://suwanu-europe.eu/international-conference/>
9. **Stanilova M.**, Traykova B., Mincheva I. & Yankova-Tsvetkova E. (2022). Soilless propagation of wild *Ericaceae* medicinal shrubs. In: 11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (International), 06-10 October, Ohrid, poster. <https://cmapseec.mfd.org.mk/list-of-posters/> Section 4
10. **Traykova B.**, Nikolova M., Stanilova M. & Aneva I. (2023). Soilless cultivation and GC/MS based metabolic profile of hydroponically propagated species of genus *Thymus* (Lamiaceae). In: 4th Interdisciplinary PhD forum with international participation, 16-19 May 2023, Sandanski, Bulgaria (Training center of the Bulgarian Academy of Sciences, Career center of TC-BAS), poster. Program and abstracts – 2, 10

Hydroponic technologies as a means of protection and cultivation of medicinal and conservation significant plant species

Boryanka Dimitrova Traykova

PhD thesis, based on 8 published original articles (equivalent to 178 standard pages, incl. 17 tables, 42 figures, and 138 references), Sofia, 2024

Summary

Hydroponic technologies encompass various methods of growing plants without soil using aqueous solutions of nutrients, with or without an artificial substrate (perlite, gravel, expanded clay pebbles, coconut husks or other inert material) acting as a mechanical support. One of the main advantages of hydroponic gardening is the significant increase in yields, as plants are cultivated under controlled environmental conditions (optimal temperature and light regime) and receive balanced nutrients according to their specific needs. Production is independent of seasons, pest infestations, soil type and pH, and soil-related weeds, diseases and pests. Hydroponic technologies lend themselves to mechanization and automation, many species are grown year-round, space is saved by introducing multi-storey vertical farming, water is used much more efficiently by recovering and recycling excess solution. In the context of climate change, hydroponic technologies are very promising and are considered to be decisive for the future of agriculture.

For the successful application of hydroponic technologies to new species, it is necessary to experimentally determine the optimal amount and ratio of the components in the nutrient solution, to choose an appropriate type of hydroponic system and substrate, as well as to know the biology of the respective species and to comply with its specific environmental requirements. Developments always begin at the laboratory level and, with favourable circumstances, reach scale-up and industrial production.

The aim of the present dissertation was the establishment of protocols for propagation and growth acceleration of selected medicinal and conservation important plant species, characterized by propagation difficulties (low germination and/or slow growth), by means of various hydroponic technologies. In addition, it was intended to verify whether the hydroponically propagated individuals retain the species-specific biosynthetic ability with respect to secondary metabolites. The following 11 species were the subject of research: *Haberlea rhodopensis*, *Thymus longedentatus*, *T. pannonicus*, *T. zygioides*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Lilium rhodopaeum*, *Hippeastrum papilio*, *Alkanna tinctoria*, *Salvia officinalis* and *Echinacea purpurea*, some of which are endemic or endangered, most with real or potential economic significance. The species were selected so that the possibilities of both seed and vegetative propagation from leaves, cuttings and bulbs could be explored. Soilless cultivation can be considered as a part of plant biotechnologies, and in some species slow growing *in vitro* propagated plantlets were used as starting material in order to accelerate their growth.

For the first time, plants of *Haberlea rhodopensis* were propagated from leaves using two aero-hydroponic systems: the vertical Green Diamond and the horizontal Aeroflo-20. Perlite is the most suitable substrate, allowing rooting of 47% of the fresh leaves and formation of 2.9 well-formed rosettes per leaf; or survival of 85% of pre-rooted leaves forming 2.2 rosettes per leaf. A total of 47 rosettes were planted in soil and acclimatized in a greenhouse, where they flowered for the past 3 years. For the first time, plants of the three target *Thymus* species were obtained hydroponically by vegetative propagation from cuttings, thus overcoming the difficult and slow rooting of cuttings in a soil substrate. For *V. vitis-*

idaea, the age of the cuttings was crucial: the best results were obtained with semi-hardened cuttings treated with IBA (100% rooted and surviving) on a Flood & Drain system with perlite substrate.

The protocol for *in vitro* propagation of the slow-growing bulb species *L. rhodopaeum* and *H. papilio* was improved by upgrading with a new step: hydroponic cultivation of the *in vitro* bulblets to accelerate their growth. This resulted in overcoming the dormancy in which *in vitro* propagated *L. rhodopaeum* bulblets fall upon repeated sub-cultivation. In 8 months, lily bulblets with well-developed roots grew 22 times, regardless of their initial weight. The presence of *Trichoderma harzianum* in the nutrient solution stimulated bulblets' rooting, while the higher values of the solution electrical conductivity led to formation of new bulblets. Many of the soil-adapted plants under greenhouse conditions formed flower-bearing stems already in the first season. From placing the *in vitro* bulbs on a hydroponic system to acclimating the plants in the *ex situ* collection and reaching flowering, it took about 2.5 years. Regarding *H. papilio*, in 16 weeks the weight of plants on the Cutting Board system increased on average 59.1 ± 24.0 times, while for the soil control it was only 11.1 ± 4.7 times.

In *S. officinalis*, seed germination and stem branching were significantly accelerated on a vertical aero-hydroponic system, with 3-month hydroponically grown plants reaching the size of 7-month soil-grown plants. The differences persisted after the acclimatization of the plants in the *ex situ* collection: the biomass yield increased by 18% and twice as many flowering stems were formed, which doubled the amount of essential oil. The time from seed germination to harvest was reduced by 5 months. In *E. purpurea* and *A. tinctoria*, it was necessary to stimulate the germination of the seeds before their hydroponic cultivation. In *E. purpurea*, the use of an aero-hydroponic system stimulated the formation of a well-developed root system, which shortened twice the time to maturity, compared to plants germinated in terrine with soil. In *A. tinctoria*, transferring the plant sprouts to the Cutting Board system led to their rapid growth and shortened the period from seed germination to the flowering phase from 12 to 6 months.

The hydroponically cultivated plants of the investigated phytochemical species retained their ability to synthesize their typical biologically active substances. Galanthamine was the major alkaloid in all *H. papilio* leaf samples taken from hydroponically cultivated plants, soil-grown control plants, and wild-type plants (about 90% of the total alkaloid content). In all samples, the related 7 alkaloids were the same. The slight decrease in galanthamine content in the dry matter of the hydroponically cultivated plants was compensated by their intensive growth: 5 times more biomass than in the soil-cultivated plants. Hydroponic cultivation of *S. officinalis* did not affect the concentration of the essential oil, but it did affect its composition and the amount of its components to some extent; however, the amount of essential oil remained twice as high during the second year of cultivation in the *ex situ* collection, which was due to the significantly higher number of generative stems formed by the hydroponically grown plants. The metabolic profiles of the hydroponically grown plants of the investigated thyme species corresponded to those of the parental plants. The methanolic extract of *T. zygioides* differed from that of *T. longedentatus* by the high content of thymol and carvacrol and the presence of some specific compounds such as geranic acid and hydroquinone.

In most studied species, protocols have been established for the successful application of this innovative method at the laboratory level. The *ex situ* collection of the Institute of Biodiversity and Ecosystem Research at the Bulgarian Academy of Sciences has been enriched with 10 new species propagated by hydroponic technologies.