



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

ланд. арх. Владимир Методиев Илинкин

Биотехнологичен подход за култивиране на *Tanacetum*
cinerariifolium (Trevir.) Sch.Bip. (Asteraceae)

Автореферат

на

Дисертация за присъждане на образователна и научна степен
“Доктор”

Научна специалност: 01.06.03 “Ботаника”

Научен ръководител: проф. д-р Марина Станилова

Научен консултант: проф. д-р Страхил Берков

София

март, 2024



BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES
INSTITUTE OF BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM RESEARCH
DEPARTMENT PLANT AND FUNGAL DIVERSITY AND
RESOURCES

Vladimir Metodiev Ilinkin,
Landscape Architect

Biotechnological approach for cultivation of *Tanacetum cinerariifolium*
(Trevir.) Sch.Bip. (Asteraceae)

Dissertation Abstract for the Doctor of Philosophy degree

Scientific specialty: 01.06.03 Botany

Supervisors: Prof. Marina Stanilova, PhD
Prof. Strahil Berkov, PhD

Sofia

March, 2024

Дисертационният труд се състои от 103 страници и включва 30 фигури, 19 таблици, 197 цитирани литературни източници.

Дисертацията е обсъдена на заседание на колегиума на отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ при Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания и е насочена от НС на ИБЕИ към защита (Протокол №23/05.04.2024).

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 29.05.2024г. от 11 ч. в заседателната зала в сградата на База 3 на ИБЕИ – БАН, ул. Акад. Георги Бончев, бл. 23, на открито заседание на Научно жури (назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ-БАН, № 26/05.04.2024 г.) в състав:

Вътрешни членове:

проф. д-р Марина Иванова Станилова (ИБЕИ-БАН)

доц. д-р Ина Йосифова Анева (ИБЕИ-БАН)

Външни членове:

чл.-кор. проф. д-р Христо Миладинов Найденски, (Институт по микробиология „С. Ангелов“)

доц. д-р Стефан Антонов Филипов (ИОХЦФ-БАН)

доц. д-р Калина Монева Данова (ИОХЦФ-БАН)

Резерви членове:

доц. д-р доц. д-р Райна Кирилова Начева (ИБЕИ-БАН)

доц. д-р Мария Проконова Генева (ИФРГ-БАН)

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

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

Използвани съкращения

ИБЕИ – Институт по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания;

B5 – *in vitro* хранителна среда, разработена от Gamborg et al., 1968;

Heller – *in vitro* хранителна среда, разработена от Heller, 1953;

MS – *in vitro* хранителна среда, разработена от Murashige & Skoog, 1962;

(½ MS) - *in vitro* хранителна среда, съдържаща двойно по-малко количество микро и макро елементи в сравнение с MS среда;

SH – *in vitro* хранителна среда, разработена от Schenk & Hildebrandt, 1972;

White – *in vitro* хранителна среда, разработена от White, 1963;

GA₃ – гибберелинова киселина;

IAA – индолил-3-оцетна киселина;

IBA – индолил-3-маслена киселина;

NAA – 1-нафтилоцетна киселина;

BAP – бензил аминоксидин;

Kin – кинетин;

GC-MS – газова хроматография - масспектрометрия;

UV – ултравиолетова светлина;

БАВ – биологично-активни вещества;

ДДТ – дихлордифенилтрихлоретан;

ppm – части на милион;

1. Увод

Растенията играят важна роля в социално-културните, духовните и здравните нужди на хората още от дълбока древност. В много развиващи се страни голяма част от населението все още разчита на народната медицина, основана на използването на лечебни и ароматни растения за здравни нужди и в бита. Все повече хора в наши дни се обръщат към алтернативни методи за лечение и използват билкови продукти както в бита, така и с фармакологично приложение. Това от своя страна води до многократно увеличаване на търсенето на съдържащите се в растенията вторични метаболити с важни биологични свойства. Част от тези вторични метаболити са използвани от дълбока древност като репелент срещу насекомите.

Насекомните неприятели по растенията са сериозен проблем за земеделието и ландшафтната архитектура. Те унищожават значителна част от земеделската продукция, а някои от насекомите са преносители на болести като малария, филарияза и др., които са опасни за човешкото здраве. Използването на синтетични инсектициди замърсява околната среда и има неблагоприятен ефект върху човека и бозайниците. Това налага търсенето на продукти, които са безвредни към околната среда, подходящи за био- и традиционно земеделие, които могат да се използват за контрол на насекомните неприятели в градските и крайградските паркове, както и прилежащи дворове към болници, училища и детски градини.

През последните години търсенето на естествени инсектициди се увеличава значително. Широко използвани като природни инсектициди са пиретрин-съдържащите. Пиретрините се извличат от растението *Tanacetum cinerariifolium* и причиняват парализа и/или смърт на насекомите в рамките на няколко минути. Те действат като контактен агент, който засяга централната нервна система на насекомите, блокирайки нервните импулси. При ниски концентрации пиретрин базираните продукти действат като репелент, като се отличават с няколко важни предимства: 1) широкоспектрност; 2) не са токсични към човека и животните; 3) лесно разградими са и безвредни за растенията.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящата докторантура е експериментално определяне на подходящи условия за размножаване на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip., чрез методите на растителните биотехнологии и селектиране на перспективни *in vitro* клонове за бъдещо изпитване в агрокултура.

2.2. Задачи

За постигане на поставената изследователска цел са планирани следните задачи:

1. Осигуряване на растителен материал (семена) от *T. cinerariifolium* от *ex situ* колекция и от естествена популация;
2. Изследване на жизнеността на семената и на кълняемостта им *in vivo* (в петриевы блюда и на различни почвени типове) и *in vitro*;
3. Инициране на *in vitro* култури от семена; Субкултивиране и изследване на видовите особености; Изследване влиянието на състава и типа на хранителните среди (макроелемент и растежни регулатори);
4. Селектиране на перспективни *in vitro* клонове за фитохимично изследване;
5. *Ex vitro* адаптация при контролирани условия във фитотрон и аклиматизация на растения от селектираните клонове на *T. cinerariifolium* в *ex situ* колекцията на ИБЕИ;
6. Създаване на лабораторен протокол за ефективно *in vitro* микроразмножаване на *T. cinerariifolium*;
7. Определяне на състава и съдържанието на пиретрини в поници, покълнали върху различни почвени типове от България, в *in vitro* култури и в цветните кошнички на аклиматизираните растения в *ex situ* колекцията.

3. Литературен обзор

3.1. Ботаническа характеристика и разпространение на *Tanacetum cinerariifolium*

Далматинският пиретрум, *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. (Syn. *Pyrethrum cinerariifolium* Trevir., *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.) Vis.) (POWO, 2023) е многогодишно тревисто растение от семейство Asteraceae (Kolák et al., 1999), с единични цветни кошнички (съцветия), разположени на облистените разклонения на стъблото, дълги обикновено 50-60 (80-100) cm (Казанецки, 1926; Ковачев, 1937; Стайков и Илиева, 1961). Растението образува рядка туфа със сивозелен цвят, който се дължи на множеството власинки, с които са покрити листата и стъблата (Стайков и Илиева, 1961). Плодосемките са продълговати, ръбести, цилиндрични с 5 до 7 ребра, стеснени в долния край, с дължина 3-5 mm и ширина 0.8-1 mm (Кабатлийска, 2005) с леко лъскава повърхност, сламеножълти до блеодокафяви (Стайков и Илиева, 1961; Vojnanský & Fargašová, 2007). Видът е изцяло кръстосаноопрашван, което прави културите силно хетерозиготни и променливи по отношение на агрономични и други характеристики (Brewer, 1968).

T. cinerariifolium е балкански ендемит, разпространен главно в Хърватия, среща се и в Албания, Босна и Херцеговина, и Черна гора (Greuter, 2006+; Grdiša et al., 2009; POWO, 2023). В Хърватия, поради засилена урбанизация, видът е подложен на риск, свързан със загуба на местообитания (Varga et al., 2022).

3.2. Екологични изисквания и култивиране на вида

В Далмация, на Адриатическото крайбрежие *T. cinerariifolium* се среща на сухи варовити терени при надморска височина от 400 до 2000 m. Почвите са силно пропускливи, каменливи, поради което през вегетационния период почвената влажност е ниска (Стайков и Илиева, 1961; Топалов, 1962; Илиева, 1967). Видът е слънцелюбив и трябва да се отглежда на открити, слънчеви места с южно, югозападно или югоизточно изложение, а засенчването има негативно влияние както върху добива на цветни кошнички, така и върху пиретриновото съдържание (Ковачев, 1937; Стайков и Илиева, 1961; Илиева, 1967; Астаджов и др., 1980).

3.3. Основни биологично-активни вещества

Характерните БАВ за *T. cinerariifolium* са пиретрините, които се свързват с инсектицидното действие на хризантемовата и пиретриновата киселини. Идентифицирани са и други типове вторични метаболити.

Терминът пиретрини се отнася до шест инсектицидни активни съставки, съдържащи се в *T. cinerariifolium*: Пиретрин-I, Цинерин-I, Ясмолин-I Пиретрин-II, Цинерин-II и Ясмолин-II (McDonnell et al., 1930). Пиретрин-I, Цинерин-I и Ясмолин-I са естери на хризантемовата киселина, докато Пиретрин-II, Цинерин-II и Ясмолин-II са естери на пиретриновата киселина. Трите естера на хризантемовата киселина обикновено се наричат с общото наименование Пиретрини-I, а естерите на пиретриновата киселина като Пиретрини-II (Head, 1973; Essig & Zao, 2001; Davies et al., 2007; Casida, 2012; Ramirez, 2013).

Пиретрините се съдържат във всички части на растението, но най-вече в цветните кошнички (Ковачев, 1937; Bhat & Menary, 1979; Jovetic, 1994; Grdiša et al., 2009). Пиретрин-I и Пиретрин-II се съдържат в най-голямо количество в сравнение с останалите пиретрини (Стайков и Илиева, 1961), като съотношението между Пиретрин-I и Пиретрин-II е приблизително 1.08 (Head, 1973).

Съотношението на пиретрините зависи от географския произход, като при реколти от Кения и Танзания е от 1.2 до 1.5, от Руанда е над 2.0, а от Папуа Нова Гвинея е между 0.7 и 1.0. Варирането може да се дължи на генетични вариации в популациите, както и на зрелостта на цветните кошнички. При по-голяма зрялост на цветните кошнички се увеличава общото количество на пиретрините, но намалява съотношението на Пиретрини I/Пиретрини II (Maciver, 1995). Промяната в съотношението най-вероятно се дължи на преминаването на Пиретрин I в Пиретрин II (Maciver, 1995; Ramirez, 2013).

3.4. Съдържание на пиретрините в природните популации и в аграрни култури

Естествените популации в Хърватия съдържат приблизително 0.60-0.79% пиретрини (Grdiša et al., 2009). Parlevliet et al. (1979) посочват вариране на пиретрините между 0.74 до 1.04% в съцветията.

В агрокултура растенията започват да цъфтят още през първата година. Най-голям брой цветни кошнички има през третата и четвъртата години, след което броят им значително намалява (Павлов, 1950). Брането на цветовете се извършва във фаза пълен цъфтеж, когато съдържанието на пиретрини е най-високо (Казанецки, 1926; Стайков и Илиева, 1961). В аграрни култури, в България масовият цъфтеж започва през последните дни на май и продължава до средата на юни (Казанецки, 1926; Павлов, 1950; Стайков и Илиева, 1961). Съдържанието на пиретрин е 1-1.2%, но може да достигне и до 2% (Павлов, 1950). В опитно поле при с. Горни Лозен, София, съдържанието на пиретрини е в границите 1.30-1.50%, а в Самоковско в границите 1.31-1.54% (Илиев и Даскалов, 1935). При проведени проучвания през 1934 г. и 1935 г. в 14 района, в България се отбелязва вариране в границите от 0.65% - 1.35% (Илиев и Даскалов, 1935) през първата година, а през втората година варирането е 0.89-1.64% (Топалов, 1936).

3.5. Пиретринови продукти

Общото количество пиретрини в екстракт е между 45 и 55% (Стайков и Илиева, 1961; Casida & Quistad, 1995a; Moorman & Nguyen, 1997; Neupane, 2004; Greenhill, 2007; Grdiša et al., 2009; Casida, 2012; Grdiša et al., 2013). Поради трудностите при разделянето и липсата на точни стандарти за всеки компонент, съдържанието на пиретриновия екстракт обикновено се анализира като общо количество пиретрини или общи Пиретрини-I и общи Пиретрини-II (Kolak et al., 1999; Essig & Zao, 2001; Kumar et al., 2005).

Пиретриновите продукти (особено алкохолните и петролните екстракти) могат да бъдат стабилни при продължително съхранение, при контролирани условия, но праховете, направени директно от цветните кошнички, могат да загубят до 20% от своята ефикасност за една година (Tattersfield, 1931; Henn & Weinzierl, 1989). Пиретрините и пиретриновите препарати са нестабилни, когато са изложени на влияние на факторите на околната среда (Henn & Weinzierl, 1989; Greenhill, 2007; Grdiša et al., 2009; Hodoşan et al., 2023).

3.6. Приложение на пиретриновите продукти

Естествените пиретрини имат някои от качествата на идеално средство за борба с насекомните неприятели (Jovetic, 1994; Hammond, 1996; Palmquist et al., 2012; Jeran et al., 2020, Matsuda, 2022) и са едни от най-важните инсектициди (Gnadinger et al., 1932; Casida & Quistad, 1995b, Ngegba et al., 2022). Те са много ефективни срещу широка гама от насекоми (Tattersfield et al., 1929; Арnaudов, 1930; Richardson, 1931; Xiating et al., 2003; Greenhill, 2007; Duchon et al., 2009; Cai et al., 2010), действайки като контактен инсектицид (Grdiša et al., 2009), а възможността за развиване на резистентност е ниска. Особено ценно е бързото парализиране на насекомите, поради което те загиват (Casida, 1980; Jovetic, 1994; Grdiša et al., 2009). Пиретрините засягат централната и периферната нервна система на

насекомите (Davies et al., 2007). Само Пиретрин I има летален ефект, а Пиретрин II има сублетален (knockdown) ефект. Според някои автори Пиретрин I е 2.5 пъти по-токсичен от Пиретрин II (Алипур и Пешевски, 1983), а според други – до 10 пъти (Tattersfield et al., 1929). Насекомите метаболизират Пиретрин II лесно и се възстановяват от “knockdown” ефекта след няколко часа (Winney, 1979).

Комбинираното използване на Пиретрин I и II има изключителен ефект за контрол на широка гама насекоми неприятели (Winney, 1979). Съотношението на Пиретрин I към Пиретрин II определя качеството на пиретриновия екстракт (Maciver, 1995). Инсектицидната активност се увеличава с увеличеното съотношение, което обикновено варира между 0.9-1.3 и не пада под 0.8, няма данни за стойности по-големи от 2.8.

Естествените пиретрини имат ниска токсичност към бозайници и други топлокръвни животни, защото са лесно разградими до неактивни форми и бързо се очистват от организма (Jovetic, 1994; Gu et al., 2003; Grdiša et al., 2009). Освен като инсектициди, пиретриновите продукти се прилагат и като репелент за защита на храни (Jovetic, 1994; Grdiša et al., 2009). Поради факта, че са безопасни за околната среда, те са водещ инсектицид в системите за биологично земеделие (Grdiša et al., 2009; Matsuda, 2022), а според Регламент (ЕО) № 834/2007 на Европейския съюз за биологично производство и етикетиране на биологични продукти е разрешено използването на пиретринови екстракти като продукти за растителна защита в биологичното земеделие. Много автори посочват, че пиретринът е най-широко използвания растително базиран инсектицид (Casida & Quistad, 1995b; Liu & Gao, 2007; Yang et al., 2012; Shah, 2012), а Jovetić (1994) го определя като най-важния естествен инсектицид.

3.7. Синтетични аналози на естествените пиретрини

Пиретрин базираните инсектициди са били едни от основните агенти за контрол на насекомните неприятели до появяването на ДДТ и хлорираните въглеводороди преди повече от 70 години. След този етап се появяват други класове инсектициди, които са все още не толкова разградими и щадящи околната среда (Singh et al., 2022; Hodoşan et al., 2023; Kumar et al., 2023). Затова пиретриновите инсектициди никога не са губили позиции като агент, използван по време на цъфтеж в районите, в които има съображения за използването на синтетични инсектициди (Silcox & Roth, 1995).

3.8. Семенно размножаване

T. cinerariifolium може да бъде размножен от семена (Георгиев, 1936; Bhat 1995), но кълняемостта на семената не е висока, особено при естествените популации (Singh & Sharma, 1989; Fulton et al., 2001b). При селекция свежите семена имат кълняемост от 76%, двугодишните – 62%, тригодишните – 53%, а на четиригодишните намалява до 36% (Илиева, 1967; Астаджов и др., 1980).

При проучване на кълняемостта на семената при различни почвени типове видът покълва при всички изследвани типове, но процентът на кълняемост не е висок и варира статистически значимо при различните почвени типове (Sladonja et al., 2014). От химичните характеристики на почвата, реакцията на почвения разтвор може да повлияе в най-голяма степен на кълняемостта на семената (Wandahwa & Van Ranst, 1996).

3.9. Вегетативно и *in vitro* размножаване

Аграрните култури от *T. cinerariifolium* обикновено се създават от вегетативни части на клонове с по-добри характеристики, тъй като растенията, получени от семена, варират значително по съдържание на пиретрин (Casida, 1973; Ikahu & Ngugi, 1988; Lindiro et al.,

2013). Съществуващите "майчини" растения се размножават вегетативно чрез разделяне на туфата на множество растения (Bhat 1995; Greenhill, 2007).

Наличието на достъп до висококачествен растителен материал е основният лимитиращ фактор пред масовото култивиране на *T. cinerariifolium*, а разработването на ефикасен *in vitro* протокол за масово размножаване на растения, с високо съдържание на пиретрини, е задача за много изследователи (Lindiro et al., 2013). Редица изследвания се основават върху използването на твърда хранителна среда и много по-рядко на течна (Staba et al., 1985; Hussain et al., 1994; Keskitalo, 1999).

Критичен етап при въвеждане в *in vitro* култура е микробното замърсяване, което трудно се елиминира, дори при стерилизация на експлантите (Hennerty et al., 1987; Misaghi & Donndelinger, 1990; Peñalver et al., 1994; Keskitalo, 1999). Бактериите могат да останат неоткрити за дълго време, тъй като използваната за *in vitro* култура среда за растеж, може да не е оптимална за растежа на бактериите или дори да го възпрепятства (Leifert & Waites, 1992; Leifert et al., 1994b; Isenegger et al., 2003). Бактериалното замърсяване е много сериозен проблем при експланти от многогодишни растения (Savela & Uosukainen, 1994; Brunner et al., 1995; Keskitalo, 1999) или от растения, растящи в полски условия (Leben, 1972; Peñalver et al., 1994; Keskitalo, 1999; Da Silva et al., 2003). Микробното замърсяване на култури от *T. cinerariifolium* може да се дължи на морфологично и генетично разнообразни бактерии (Dolinšek et al., 2010). Повечето микроорганизми, открити и идентифицирани в *in vitro* култури, са Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии (Hennerty et al., 1987; Peñalver et al., 1994; Brunner et al., 1995; Keskitalo, 1999; Keskitalo et al., 2001), филаментозни гъби, дрожди (Leifert et al., 1994a; Keskitalo, 1999).

Добавянето на антибиотик в средата обикновено се използва за контрол на бактериално замърсяване, но антибиотиците може да повлияят върху растежа на *in vitro* културите и да променят морфогенезата им (Teng & Nicholson, 1997; Eady & Lister, 1998; Keskitalo et al., 1998; Teng & Teng, 2000; Bergant et al., 2005). В свое изследване върху чувствителността на пиретринова калусова култура към антибиотици, Bergant et al. (2005) докладват, че тя е повлияна от: генотипа, продължителността на третиране и концентрациите на антибиотиците. Въпреки че по-високите концентрации на антибиотици могат да бъдат използвани за контролиране на бактериалното замърсяване, те значително намаляват растежа на калуса.

Характеристиките на хранителната среда могат да бъдат основен фактор за създаване на високоефективна *in vitro* култура. Посочва се (Mukundan & Hjortso, 1991), че при първоначално рН в границите 5.0–6.0, а според някои автори, при първоначално рН 5.7 и среда ½ MS (Hitmi et al., 1998), се наблюдава оптимална скорост на растеж, докато изменението на рН до 7.0 – 8.0 има инхибиращ ефект. Това може да се дължи на по-доброто усвояване на амонячния и нитратния азот при рН 5.7 (Hitmi et al., 1998). При проучване за влиянието на видовете среди (MS, B5 White и Heller) при растеж на калус, скоростта на растежа е значително по-висока при среди MS и B5 отколкото при средите White и Heller (Hitmi et al., 1998).

Литературните данни, по отношение на вкореняването *in vitro*, са противоречиви. В проучвания (Lindiro et al., 2013; Waseem et al., 2009) се посочва, че IBA дава по-добри резултати за индуциране на корени от микроиздънки на *T. cinerariifolium*, отколкото NAA. Obukosia et al. (2005) посочват, че NAA е по-добра при вкореняване, отколкото IBA. Съобщава се, че образуване и развитие на корени може да бъде наблюдавано 15 дни след въвеждането на експлантите в ½ MS среда, обогатена с 0.2 mg.l⁻¹ IAA и 0.1 mg.l⁻¹ и „готова формула от ауксини под формата на прах“. При опит със среди MS, B5 и SH, допълнени с различни концентрации на NAA, оптимален резултат се наблюдава при среда B5, допълнена с 2 mg.l⁻¹ NAA, при което 100% от регенериралите издънки развиват корени със средно 16 корена в рамките на 3 седмици, (Hedayat et al., 2009).

Hedayat et al. (2009) коментират, че комбинацията от BAP и NAA, добавени към среда MS в определени концентрации (1.5 mg.l^{-1} BAP + 2 mg.l^{-1} NAA), е подходяща за получаване на голям брой нови издънки за кратко време. Среда MS е по-добра от среди SH и B5 при размножаване на резници. Според други автори MS среда успешно може да бъде прилагана при размножаване на други видове *Chrysanthemum* (Roest & Bokelmann, 1973; Kaul et al., 1990; Hedayat et al., 2009). Вероятно това е свързано със състава на MS средата, като оптимална за представители на род *Tanacetum* (Hedayat et al., 2009). Най-голяма дължина на издънките се наблюдава в среда без BAP, а добавянето на този цитокинин води до индуциране на по-голям брой издънки и намаляване на дължината им (Hedayat et al., 2009). При изследване на три среди (MS, B5 и SH) най-голямо тегло свежа биомаса е иницирано при среда MS (Hedayat et al., 2009).

При изследване влиянието на средите върху съдържанието на пиретрини в *in vitro* културите (MS, B5, White и Heller), при средата на White съдържанието на пиретрини е значително по-ниско, докато при среди MS и B5 натрупването на Пиретрини I (естери на пиретриновата киселина) е почти еднакво. При използване на MS среда с по-ниска концентрация на макро- и микроелементи ($\frac{1}{2}$ MS) се увеличават натрупването на биомаса и концентрацията на пиретрини, но при намаляване на концентрацията на хранителни елементи с 66%, намаляват както количеството на натрупаната биомаса, така и количеството на пиретрини (Hitmi et al., 1998).

4. Материали и методи¹

При изследване на жизнеността и кълняемостта на семена от *T. cinerariifolium* са използвани материали и метод описани по-долу.

За изходен материал са използвани семена от *ex situ* колекцията на *T. cinerariifolium* от с. Богдан, Пловдивска област (прясно събрани зрели семена, семена съхранявани в продължение на 1, 2 и 3 години). Покълването на семената е извършено *in vivo* върху филтърна хартия в Петриеви блюда и *in vitro* върху основна MS среда Murashige & Skoog (1962), допълнена с 30 g/l захароза и втвърдена с 6.5 g/l растителен агар (Duchefa, NL), при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и 16 часа светлина дневно, в продължение на 8 седмици, по 4 повторения по 100 семена всяко. Предварително семената са накиснати във вода за 24 часа. За определяне на жизнеспособността е използван тетразолов тест (Peters, 2000) прясно събрани зрели семена и семена, съхранявани 1, 2 и 3 години с 4 повторения по 100 семена. Статистическите анализи са извършени с SPSS, Numbers и Excel.

При изследване на влиянието на почвените фактори върху кълняемостта на семена от *T. cinerariifolium* са използвани материали и метод описани по-долу.

В представителни участъци от всеки почвен тип от 15 точки са взети прикопки, като е използвана систематична схема на пробовземане (Petersen & Calvin, 1996). Пробите са взети на дълбочина 0-20 cm. Петнадесетте почвени проби от всеки тип почва са хомогенизирани и са редуцирани до тегло от 2 kg, като по този начин е получена средна проба за всеки тип почва. В саксии, в четири повторения са заложени по сто семена от естествена популация на *T. cinerariifolium* (МАРО2804 регистрационен номер от Хърватската база данни за растителни генетични ресурси).

Определени са следните почвени характеристики: Обемна плътност (BD, g.cm^{-3}), DIN ISO 11272:1998, 2001; Обща порьозност (TP, %), чрез изчисляване на обемна плътност и относителна плътност (Lorraine & Flint, 2002); Механичен състав на почвата (Пясък - 2mm-63 μm ,%; Прах - 63 μm -2 μm ,%; Глина < 2 μm ,%), седиментационен метод (ISO 11277:1998); Почвена киселинност (pH във вода) - потенциометрично с pH метър WTW 720 (ISO 10390: 2002); CaCO_3 - Обемен метод (ISO 10693: 1995); Почвено органично вещество (SOM, %) ISO 14235:1998; Съдържание на общ азот по Kjeldahl (TKN, %), модифицирана версия на класическия метод на Kjeldahl (ISO 11261:2002); P_2O_5 (mg.100g^{-1}) - екстракция с амониев ацетат и калциев лактат-pH 4.2 (UV-VIS Perkin Elmer Lambda 5 (Ivanov, 1984); K_2O (mg.100g^{-1}) - екстракция с амониев ацетат и калциев лактат-pH 4.2 (Jenway php 7) (Ivanov, 1984).

Статистическите анализи са извършени с SPSS, Numbers и Microsoft Excel.

¹ За улеснение представените материали и методи в този раздел са представени в съответствие със статиите от дисертацията, съгласно чл. 9 от „Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ – БАН“, при представяне на дисертацията под формата на скрепени научни публикации.

При *in vitro* размножаването и аклиматизацията са използвани материалите и методите описани по-долу.

Инициране на *in vitro* културите.

Първоначалните изследвания са проведени със семена от *T. cinerariifolium*, от частна *ex situ* колекция в с. Богдан, България. За последващите изследвания са използвани семена от естествена популация на *T. cinerariifolium* (МАРО2821). Семената са дезинфекцирани чрез стандартна процедура за повърхностна стерилизация: накисват се 1 минута в 70% EtOH, след това 10 минути в белина (Cl < 0.5%) и се изплакват три пъти с дестилирана стерилна вода за 5, 10 и 15 минути. Семената, събрани от колекцията в с. Богдан, са заложени върху три хранителни среди на основата на MS (Murashige and Skoog 1962): среда MS без растежни регулатори (PGRs) и две среди, допълнени с кинетин (Kin, Duchefa, NL) и индол-3-бутирова киселина (IBA, Duchefa, NL) в различни концентрации: 1.0 mg/L Kin и 0.5 mg/L IBA (среда K1) и 0.2 mg/L Kin и 0.1 mg/L IBA (среда K2I1). Семената с произход от Хърватия са заложени върху контрола - MS среда (MS), три MS-базирани среди, допълнени с антибиотик Medaxone (активно съединение цефтриаксон натрий) в концентрации 100 mg/L (среда MS100M), 200 mg/L (среда MS200M) и 300 mg/L (среда MS300M), както и среда B5 (Gamborg et al., 1968) без растежни регулатори. Допълнително, по време на субкултивирането заедно със среда MS200M се използва среда MS200M, допълнена с три концентрации на Ca (30, 75 и 120 mg/L), добавени като CaCO₃. Всички хранителни среди съдържат 30 g/L захароза и са втвърдени с 6.5 g/L растителен агар (Duchefa, NL). Автоклавира се на 121 °C, под 1 atm, за 20 минути и след това се поставят в пластмасови контейнери с пасивна вентилация. Използват се четири серии от по 100 семена за всеки вариант на хранителна среда. Допълнително е изследвано култивирането в система за временно потапяне (TIS) с растения, взети от *in vitro* култура с произход от Хърватия, растящи върху среда MS200M, втвърдена с агар. Използвани са шест контейнера RITA[®], по 10 растения на контейнер, с 200 mL течна среда MS200M, растенията са временно в контакт с хранителната средата за 5 минути, 4 пъти на ден. Условието в помещението за култивиране са: 16/8 часа светлина/тъмнина и температура 23±2 °C денонощно. Клоновете, получени чрез *in vitro* размножаване са селектирани въз основа на броя на оцелелите растения.

Субкултивиране.

Два месеца след началото на експериментите пониците се разделят на горна и долна част, като корените се отстраняват. По този начин се получават експланти от стъблени сегменти. Клонове, получени от едно семе, са създадени чрез няколко последователни субкултивирания върху свежа среда със същия състав като съответната първоначална хранителна среда. Субкултивирането се извършва в пластмасови контейнери. Новообразуваните разклонения се отделят, а по-дългите се нарязват допълнително на сегменти. Експлантите се развиват в нови растения. Размножителният коефициент (PC) се изчислява като среден брой получени *in vitro* растения на експлант. Субкултивирането се извършва на интервали от около два месеца, получени от семена, събрани от колекцията в с. Богдан, и на интервали от три седмици за тези, произхождащи от популация от Хърватия. Субкултивирането върху модифицирани MS среди, съдържащи по-високи концентрации на Ca, се извършва всеки месец. Инфектираните и некротизиралите растения се отстраняват периодично по време на всяко субкултивиране.

Ex vitro адаптация и аклиматизация на открито.

Адаптирани са 360 растения, от четири избрани клона, получени от семена, произхождащи от популация от Хърватия, покълнали на среда MS200M и размножени на среда MS200M, с добавен 75 mg/L Ca. Растенията са прехвърлени в саксии с почвена смес (Light mix Biobiss, Франция) и първо са адаптирани *ex vitro* в растежна камера (POL-EKO

Апаратура, Полша) в продължение на 6 седмици (при стриктен контрол на температурата и светлината и постепенно намаляване на относителната влажност на въздуха от 90% на 60%). След това са преместени във фитотронно помещение с контрол на параметрите на околната среда в по-широки граници. Оцелелите растения са преместени в неотопляема оранжерия и през октомври 2019 г. четири растения от клон са аклиматизирани на открито в *ex situ* колекцията на IBER, засадени на разстояние 40 cm едно от друго и на 40 cm между редовете. Броят както на разклоненията на стъблата, така и на цветните кошнички на индивид са преброени по време на първия и втория цъфтеж през 2020 г. Използвани са Microsoft Excel (версия 16.6) LSD Post Hoc (SPSS, версия 26) за статистически анализ.

При фитохимичните анализи са използвани материали и методите, описани по-долу.

Растителен материал. Растителният материал от *T. cinerariifolium* са *in vitro* отгледани клонове, които са инициирани от семена от популация (МАРО2821), размножени и *ex vitro* адаптирани растения. Използвани са по два паралелни образци за всеки клон от *in vitro* културите, като всеки образец съдържа 32 изсушени *in vitro* индивида с отстранени корени, високи около 6–7 cm. Четири адаптирани растения от всеки клон са събрани при максимален цъфтеж през юни и септември, по две проби на растение на сезон, като всяка проба е съставена от 10 изсушени цветни кошнички. Поници, получени от семена (от популация (АРО2821), поникнали върху шест почвени типа, са използвани като са съставени смесени проби (по почвени различия), като всяка смесена проба съдържа по 14 изсушени надземни части на двумесечни индивиди с височина около 10 cm всеки.

Екстракция на растителния материал. Сто милиграма от сухия и смлян растителен материал е екстрахиран с 1 mL n-хексан в Eppendorf виалка с обем 2 mL. Петдесет микролитра нонадеканова киселина с концентрация 1 mg/mL са добавени в началото на процедурата за екстракция като вътрешен стандарт. След 24 часова екстракция при стайна температура 500 μ L от растителният екстракт на всяка проба е прехвърлен в стъклена виалка за качествен и количествен Газ хроматографски-масспектрален анализ (ГХ-МС) анализ.

ГХ-МС анализ на получените хексанови екстракти е извършен на газов хроматограф Thermo Fisher Focus GC, свързан с Thermo Fisher DSQ мас детектор (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), оборудван с колона DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m), работещ в режим на EI при 70 eV. Пълните условия за провеждане на анализа са описани от Berkov et al. (2012). Съединенията са идентифицирани чрез сравнение на техните мас спектри и индекси на задържане (RI) със стандартни съединения.

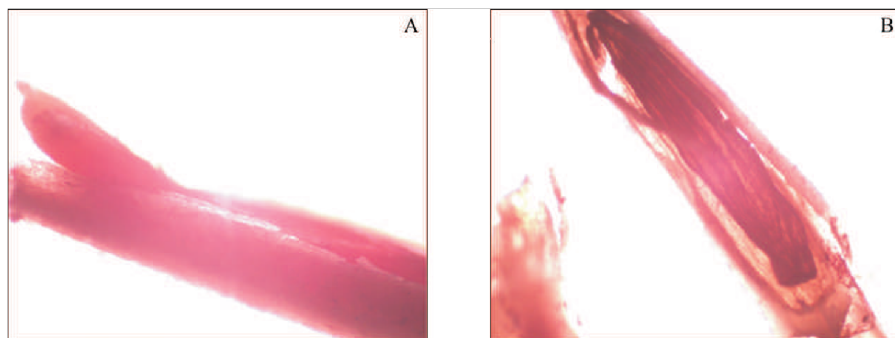
Статистически анализи. Статистическите анализи са извършени чрез One-way ANOVA Post Hoc LSD.

5. Резултати и Обсъждане²

5.1. Жизненост и кълняемост на семена.

5.1.1 Жизненост и кълняемост на семена *in vivo* и *in vitro*

Жизнеността на семената е определена чрез тетразолов тест. В зависимост от оцветяването след теста, семената на *T. cinerariifolium* са оценени като жизнеспособни или нежизнеспособни и групирани в два класа: Клас 1 – червени жизнени семена (Фиг. 1А) и Клас 2 - неочветени и празни нежизни семена (Фиг. 1В).



Фиг. 1. Жизненост на семена: А – Жизнено семе; В – нежизнено семе

Семената на *T. cinerariifolium* се характеризират с ниска жизненост и кълняемост. Процентът на жизнените семена е най-висок за току-що събрани зрели семена и намалява почти два пъти след една година съхранение и почти четири пъти след две години съхранение, докато след 3 години не бяха открити жизнени семена (Таблица 1). Процентът на нежизнеспособните семена е най-нисък за току-що събраните семена и се увеличи за семена, съхранявани една, две и три години. Процентът на празни семена остава висок и стабилен. Други автори също съобщават за висок процент на празни семена при *T. cinerariifolium* (Delac et al., 2018).

T a b l e 1

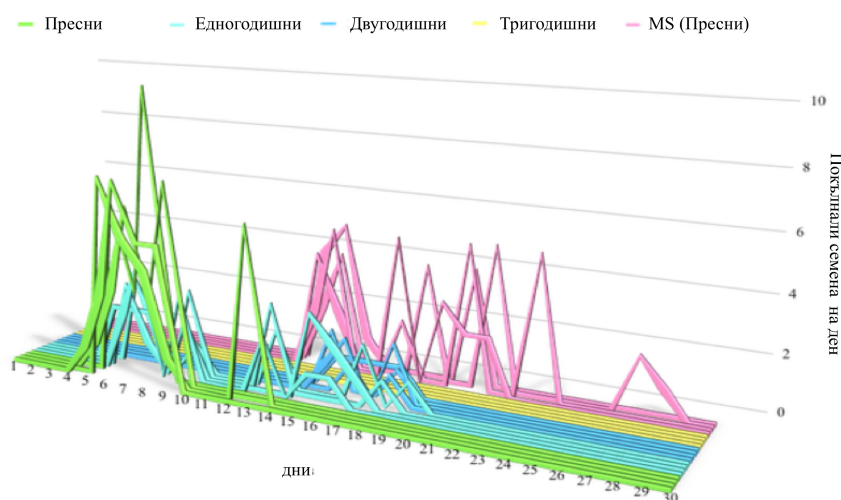
Seeds viability in vivo and seeds germination in vivo and in vitro

Seeds		In vivo				In vitro
		Fresh	1-year storage	2-year storage	3-year storage	Fresh
Viability	Viable (%)	22.25± 2.22	13.25± 1.71	5.25± 0.96	0.00± 0.00	–
	Non-viable (%)	11.00± 6.38	16.75± 4.11	26.50± 2.65	33.25± 3.77	–
	Empty (%)	66.75± 5.19	70.00± 3.56	68.25± 2.75	66.75± 3.77	–
Germination (%)		20.75± 1.71	12.00± 1.41	3.50± 0.58	0.00± 0.00	17.75± 1.26

² За улеснение представените резултати и дискусия в този раздел са разделени и са в съответствие със статиите от дисертацията, съгласно чл. 9 от „Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ – БАН“, при представяне на дисертацията под формата на скрепени научни публикации.

Вследствие на ниската жизненост на семената, процентът на покълване намаля. Като цяло успехът на покълването и производството на растения са свързани с редица фактори, като сред тях ключова роля играе качеството на размножителния материал (Sladonja et al., 2014). Качеството на семената и кълняемостта при Далматинския пиретрум са изследвани от Delac et al. (2018) и Li et al. (2011), които ги смятат за определящи фактори за успешното производство на растения. Качеството на семената на *T. cinerariifolium* зависи от редица фактори, като количеството на валежите, почвената влага, температурата и наличието на хранителни вещества, които са достъпни за растенията.

Резултатите показват, че прясно събраните семена започват да покълват *in vivo* на 5-ия ден, а периодът на покълване продължава само 5 дни, докато *in vitro* покълването на семената се забавя, като се наблюдава между 13-ия и 28-ия ден (Фиг. 2). Съхранението на семената за 1 година води до удължаване на периода на покълване, а 2-годишното съхранение води до забавяне на самото начало на покълването (Фиг. 2).



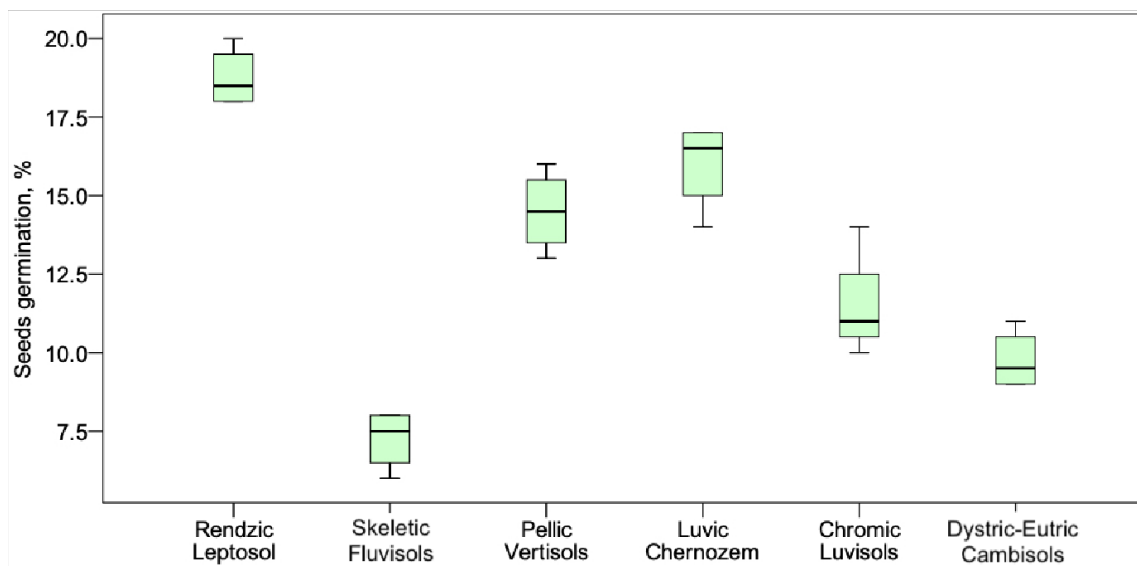
Фиг. 2. Динамика на кълняемостта на семената при различен период на съхранение и при условия *in vivo* и *in vitro*

Качеството на семената зависи както от зрелостния стадий на семената при прибиране, така и от температурите по време на цъфтежа и развитието на семената (Fulton, 1998). Автори съобщават за ниски проценти на покълване при семената, събрани от няколко естествени популации на *T. cinerariifolium* в Хърватия, въпреки че процентът на покълващите семена варира между отделните популации от 6 до 27%. Нашите данни относно покълването на свежи семена са сходни с данните, установени за семената от естествените популации (Delač et al., 2018).

5.1.2 Влияние на почвените характеристики върху кълняемостта на семената

Съществуват статистически значими разлики в кълняемостта на семената между всички типове почви с изключение на Pellic Vertisols/Luvic Chernozem и Chromic Luvisols/Dystric-Eutric Cambisol. Най-висок процент на кълняемост се наблюдава при Rendzic Leptosols (Фиг. 3), при които се срещат естествените популации на вида. Тези почви се характеризират с високо съдържание на CaCO_3 , силно водопропускливи и високо скелетно участие (Staykov & Ilieva, 1961; Topalov, 1962; Patra, 2007). Автори посочват, че *T. cinerariifolium* няма изисквания към запасеността на почвата с хранителни елементи и се развива добре както на типични горски почви, така и на Vertisols (Staykov & Ilieva, 1961;

Alipur & Peshevski, 1983). Въпреки това има статистически значими и достоверни различия в кълняемостта между горските почви (Chromic Luvisols, Dystric-Eutric Cambisol) и почвите с черноземен тип на почвообразуване (Chernozem, Vertisols).



Фиг. 3. Box-plot графика на кълняемостта на семена при различни почвени типове

Наблюдават се достоверни линейни регресии между изследваните физични параметри и кълняемостта на семената в различните почви. Съществува отрицателна статистически значима линейна регресия между обемната плътност и кълняемостта на семената. Тези данни потвърждават резултатите от предишни изследвания, според които видът расте добре на водопроницаеви почви (Staykov & Ilieva, 1961; Kolak et al., 1999, Patra, 2007; Greenhill, 2007).

Наблюдава се статистически значима регресия между глинестата фракция и кълняемостта на семената, което потвърждава резултати от проучване на други автори (Sladonja et al., 2014). Установени са статистически значими положителни линейни регресии между $pH(H_2O)$, съдържанието на $CaCO_3$ и покълването на семената, което вероятно се дължи на факта, че естествените популации на *T. cinerariifolium* в Хърватия се срещат както на варовикови почви, така и върху твърд варовиков субстрат (Kolak et al., 1999; Grdiša et al., 2013; Sladonja et al., 2014, Mihovilović, 2014). В своето изследване Sladonja et al. (2014) установяват взаимовръзка между pH и покълването на семената, но не и между $CaCO_3$ и покълването на семената.

Съществуват статистически значими регресии (полиномни) между почвеното органично вещество (SOM), общия азот по Келдал (TKN) и покълването на семената. Наблюдава се линейна регресия между усвоимия фосфор (P_2O_5) и покълването на семената, докато няма статистически значима регресия между калиевия оксид (K_2O) и покълването на семената. Данните за SOM, TKN и P_2O_5 не потвърждават тези, публикувани от Sladonja et al. (2014) за липсата на корелации, а данните за K_2O са в съответствие с публикуваните от Sladonja et al. (2014) за липсата на корелации.

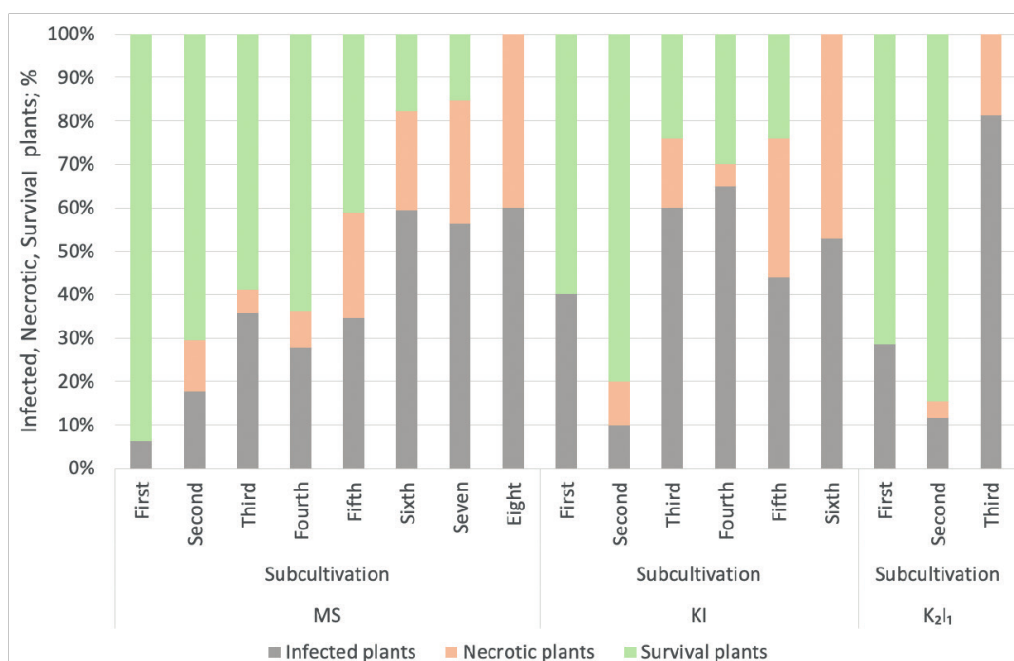
Почвените условия, при които се среща вида, най-вероятно са причината за високата степен на покълване на семената на *T. cinerariifolium* при Рендзини, които се характеризират с благоприятни физични свойства, като: водоустойчива трохо-зърнеста структура, порьозност и обемна плътност (Ilinkin et. al., 2017), които предотвратяват

преовлажняването, установено като една от причините за сигурна и бърза смърт на *T. cinerariifolium* (Staykov & Ilieva, 1961).

5.2 *In vitro* размножаване и аклиматизация

In vitro култивиране върху среда с добавени растежни регулатори (семена от с. Богдан)

Деветнадесет *in vitro* клона на Далматински пиретрум, получени от едно семе, са размножени върху MS, KI и K₂I₁ среди, до осем субкултивирания. Експлантите формираха едно или повече растения, а наличието на растежни регулатори в средата стимулира образуването и удължаването на издънките. В някои култури са забелязани ендифитни бактерии, които причиняват некроза и загуба на цели клонове. Наличието на Kin и IBA увеличава размножаването на микроорганизмите, тъй като 81.3% от растенията, получени на среда K₂I₁, и 65.0% от получените на среда KI загиват, поради наличие на микробиална флора (Фиг. 4), като и при контролата (MS среда) се наблюдава значително количество на загинали растения. След всяко субкултивиране броят на растенията, загинали поради инфекции или некроза, се увеличава. Наблюдава се некроза както при издънки, така и при вкоренени растения. Най-висок процент оцелели растения е наблюдаван на MS среда без растежни регулатори, но след осмото субкултивиране всички растения са засегнати от некроза или микробно замърсяване.

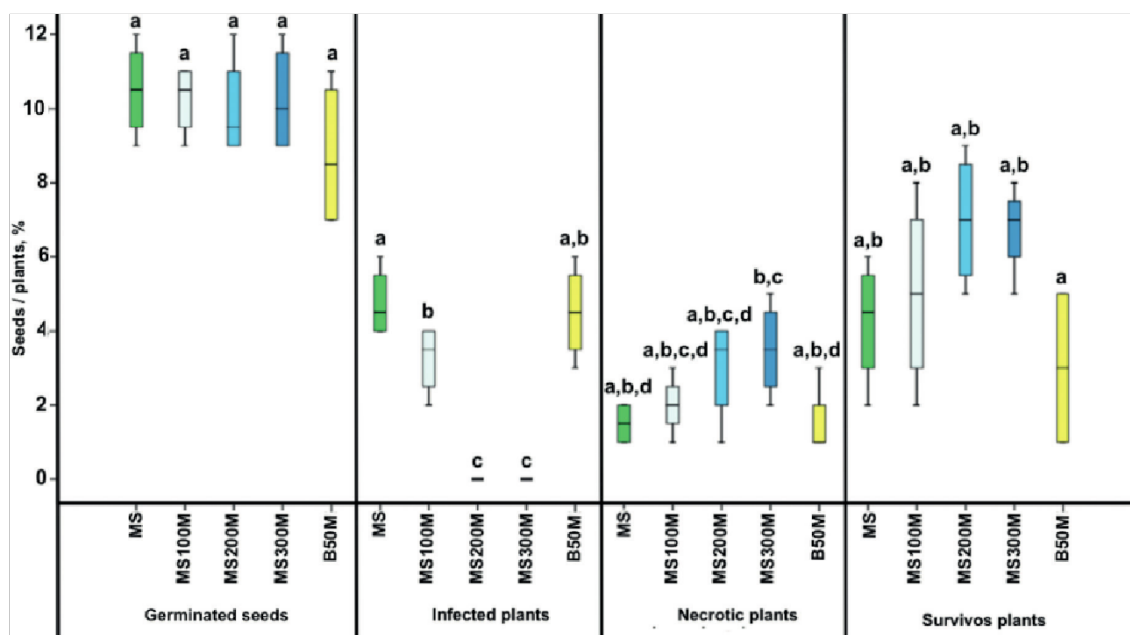


Фиг. 4. Влияние на растежните регулатори върху оцеляемостта на растенията в *in vitro* култура.

In vitro култивиране върху среда с добавен антибиотик (семена от Хърватия)

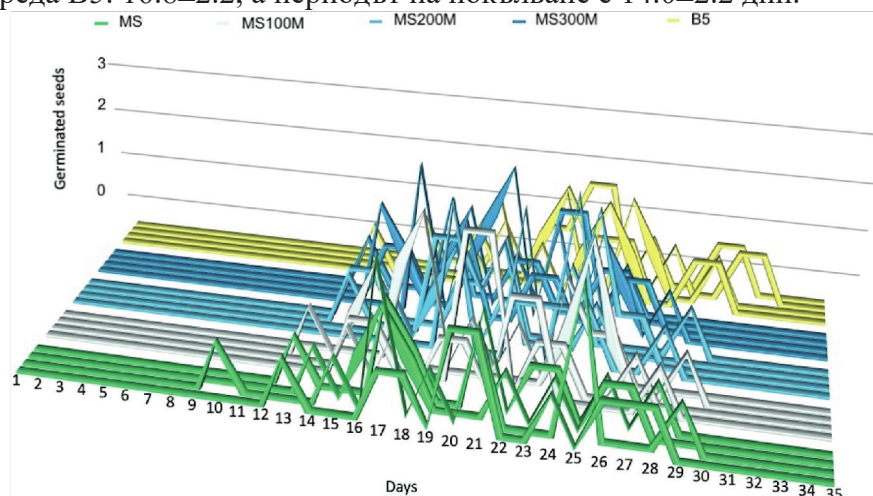
Покълването на семената върху пет хранителни среди: основни MS и B5, и MS среди с добавен антибиотик – Медаксон в различни концентрации е представено на Фиг. 5. Към момента на първото субкултивиране броят на заразените поници на среда MS100M е по-нисък, отколкото на контролата - MS среда. При двете среди съдържащи по-високи концентрации на Медаксон, не са наблюдават заразени поници. Най-висок процент оцелели

in vitro поници се наблюдава на среди: MS200M и MS300M. Въпреки това, с повишаване на концентрацията на антибиотика се наблюдава ясна тенденция към увеличение на процента на некротизирани растения, поради което средата MS200M е оценена като най-добра за инициране на *in vitro* култура, осигурявайки контрол на бактериалната микрофлора и най-голям брой оцелели поници.



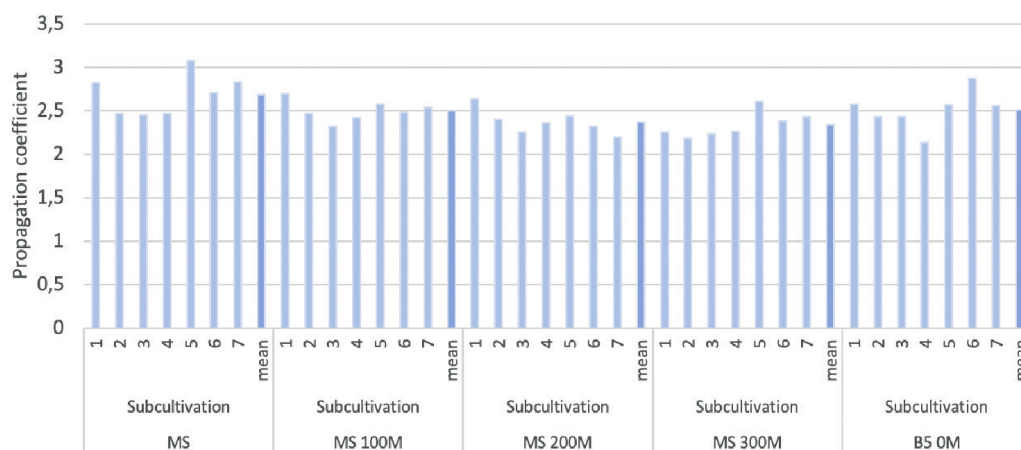
Фиг. 5. Кълняемост на семената и оцеляване на пониците, като проценти от всички заложили семена на среди с добавен антибиотик.

Съставът на средата повлиява времето, необходимо за покълване на семената, но не се наблюдава отчетлив пик на енергията на кълняемост при нито един от вариантите (Фиг. 6). Максималният процент покълнали семена за един ден е 3%. Семената започват да покълват най-рано на контролата – MS среда (на 12.5 ± 1.7 дни), но продължителността на покълването им е най-дълга на тази среда (15.5 ± 2.5 дни). Покълването на семената във всички среди, съдържащи антибиотик, започна около 15-ия ден и продължителността е по-кратка (12.5 ± 2.9 дни за MS100M, 11.5 ± 2.5 дни за MS200M и 11.5 ± 0.6 дни за MS300M). Най-продължителното време, необходимо за започване на покълване на семената, е при хранителна среда B5: 16.8 ± 2.2 , а периодът на покълване е 14.0 ± 2.2 дни.



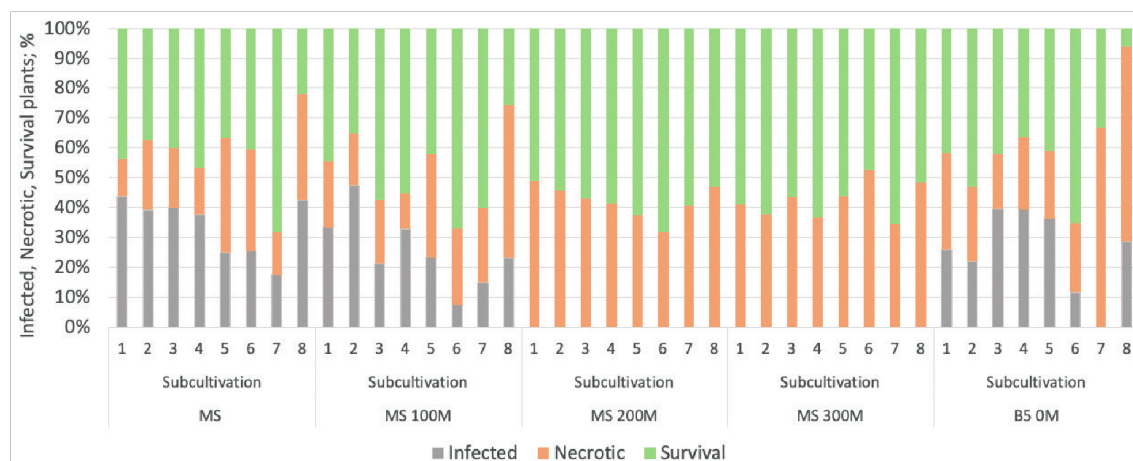
Фиг. 6. Ефект на състава на хранителните среди и антибиотика върху енергията на кълняемост.

Средните стойности на размножителния коефициент на всички субкултивирания, за всяка среда са представени на Фиг. 7. Културите, отглеждани на среда с добавен антибиотик, показват тенденция към леко намаляване на темповете на размножаване в сравнение с контролата (MS хранителна среда). Културата на B5 хранителна среда има по-нисък размножителен коефициент, който е близък до културата, отглеждана на MS100M (съдържаща Медаксон в най-ниската концентрация). Коефициентът на вариране на размножителния коефициент е по-висок в случаите без антибиотици (8.82% за среда MS и 8.83% за среда B5) от този, при средите съдържащи Медаксон (4.75% за MS100M, 6.08 за MS200M и 6.22% за MS300M).



Фиг. 7. Влияние на концентрациите на антибиотик върху *in vitro* култури от *T. cinerariifolium*.

При всички варианти и субкултивирания се отчитат загинали растения. В хранителните среди без добавен антибиотик (MS и B5) само няколко растения оцеляха, като загиванията са както поради бактериални замърсявания, така и поради некроза (фиг. 8). В края на периода на субкултивиране (8 месеца) оцелелите растения на MS и B5 среда са съответно 15 и 3, докато върху среда с добавен Медаксон техният брой е значително по-висок: 58 на среда MS100M, 671 на MS200M и 114 на MS300M. Всички растения са добре оформени, вкоренени и готови за *ex vitro* адаптация. Бактериалното замърсяване е напълно елиминирано в среда, съдържаща 200 или 300 mg/L Медаксон. Въпреки това, най-високата концентрация на антибиотик води до инхибиране на размножаването на издънките, тъй като броят на *in vitro* растенията при 8-то субкултивиране е почти 6 пъти по-висок в средата с добавен антибиотик 200 mg/L Medaxone.

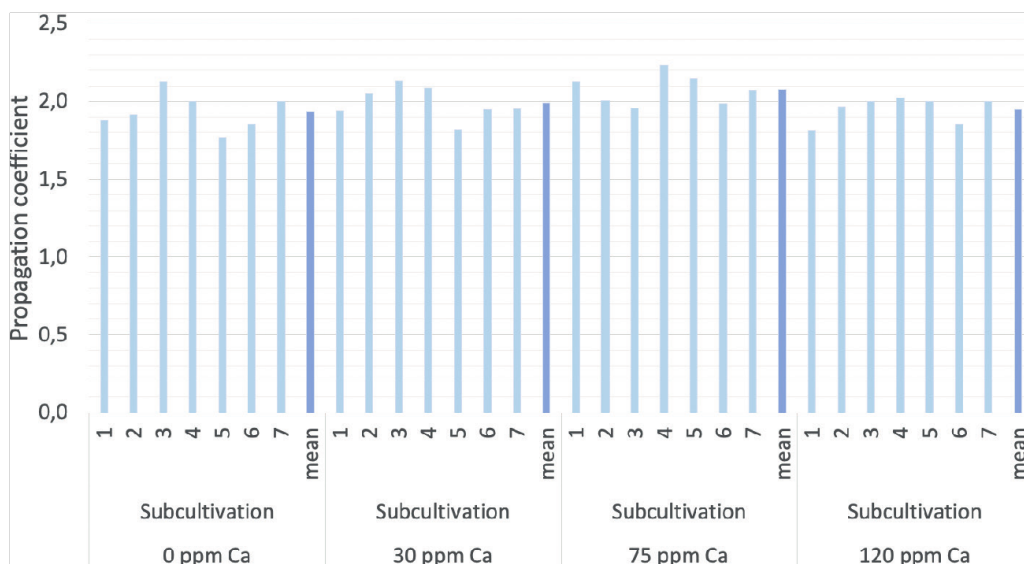


Фиг. 8. Влияние на концентрациите на антибиотик върху *in vitro* култури от *T. cinerariifolium*.

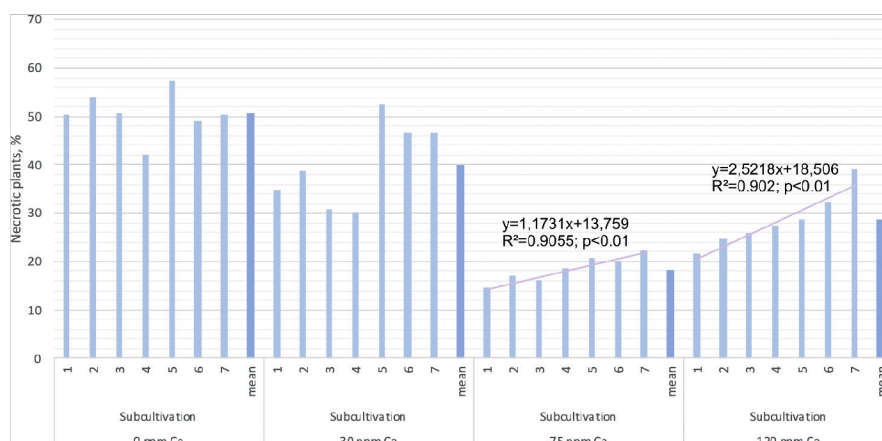
За нормалния си растеж и развитие растенията се нуждаят от макроеlementи и микроelementи, като оптималните им концентрации могат да варират за отделните видове. Най-често използваните твърди хранителни среди за *in vitro* размножаване на растения са MS и B5, както и техните модификации, с или без добавяне на растежни регулатори. Присъствието на бактериална микрофлора може да бъде критично за инициирането на *in vitro* култура, въпреки дезинфекцията на първичните материали за иницииране на *in vitro* култури (Hennerty et al. 1987; Misaghi & Donndelinger 1990; Keskitalo 1999). Обикновено съставът на хранителните среди за *in vitro* размножаване на растения не е оптимален за микроорганизмите или инхибира тяхното развитие, поради което присъствието им в културата може да остане незабелязано за дълго време (Leifert и Waites 1992; Leifert et al. 1994; Isenegger et al. 2003). Обикновено бактериалната микрофлора се развива скоро след прехвърлянето на култури към нова хранителна среда, тъй като по време на субкултивиране корените се отстраняват и растенията се нарязват на сегменти, което води до стрес. Антибиотиците обикновено се добавят към хранителната среда за контролиране на бактериална микрофлора, но те могат да повлияят на морфогенезата на *in vitro* културите и да забавят техния растеж (Teng & Nicholson 1997; Eady & Lister 1998; Keskitalo et al. 1998; Teng & Teng 2000; Bergant et al. 2005). Ефективността на антибиотиците варира в зависимост от вида на растението, а понякога дори зависи от специфичния генотип на индивиди от един и същ вид (Keskitalo et al. 1998; Bergant et al. 2005).

Влияние на Са в модифицирана MS при *in vitro* култура от *T. cinerariifolium*

MS хранителна среда съдържаща 200 mg/L Medaxone е модифицирана с добавяне на различни концентрации на Са, добавен като СаСО₃. Броят на некротизиралите растения е значително повлиян и е представен на фиг. 9. Варирането на размножителния коефициент намалява с увеличаването на концентрацията на добавения Са: върху среда MS200M без добавен Са е 6.04; докато при 30 mg/L Са е 5.40; при 75 mg/L Са – 4.80, а при 120 mg/L Са – 4.24. Най-нисък процент некротизирали растения се забелязва на среда, съдържаща 75 mg/L Са, следвана от тази на среда със 120 mg/L Са. Въпреки това, с увеличаването на субкултивациите, процентът на некротичните растения върху среда, допълнена с Са, се увеличава и в случая на двете по-високи концентрации тези тенденции са статистически достоверни. При най-високата концентрация (120 mg/L Са), тази регресия е много изразена (фиг. 10), следователно модифицираната MS среда, допълнена със 75 mg/L Са и съдържаща 200 mg/L Medaxone, е избрана като най-добра за *in vitro* размножаване на *T. cinerariifolium*. Не се наблюдават повече заразени растения, а процентът на некротичните растения намалява три пъти, което води до образуване на 38.06 ± 10.11 нови растения на начален експлант за период от 7 месеца.



Фиг. 9. Влияние на Са върху размножителната способност при различни концентрации на Са в *in vitro* култури от *T. cinerariifolium*.



Фиг. 10. Влияние на увеличаването на концентрацията на Са в средата върху честотата на некротизирани растения в *in vitro* култура от *T. cinerariifolium*.

Некротизата, наблюдавана в *in vitro* култури на *T. cinerariifolium*, най-вероятно се дължи на недостатъчно количество калций в най-широко използваните среди. *T. cinerariifolium* не е взискателен към запасеността на почвата с хранителни елементи, но се развива добре на карбонатни почви (Henningsberg 1941; Astadzhov et al. 1980). Според някои автори естествените популации на вида растат върху карбонатни почви и скалисти терени (Sladonja et al. 2014). Физиологичните функции на калция при растенията са свързани с клетъчното делене, нормалната функция на клетъчната мембрана и активирането на ензимни реакции, които благоприятстват фотосинтезата. Калцификацията укрепва клетъчните стени на растенията, увеличавайки тяхната устойчивост на инфекции (Gorbanov et al. 2005; George et al. 2007).

Оптимален резултат е постигнат при междинната концентрация на калций на трите изследвани концентрации. Калцийт е изключително важен за *in vitro* морфогенезата, особено когато се използват PGR като ауксини и цитокинини (George et al. 2007). Това може да обясни по-големия брой загинали растения, субкултивирани на среди съдържащи растежни регулатори без допълнително добавени антибиотик и Са. В *in vitro* култури добавянето на калций като CaCl_2 не се препоръчва, тъй като може дори да доведе до

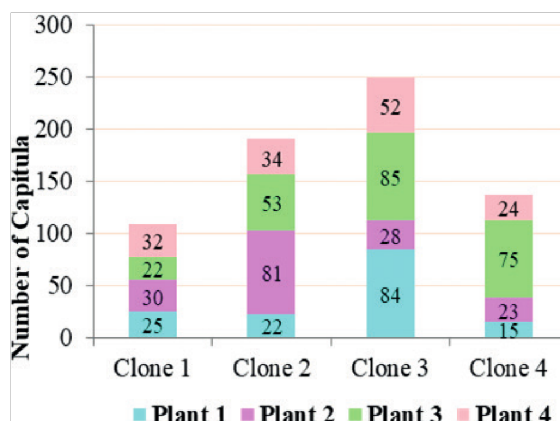
значително увеличаване на хлора до токсични нива (George et al. 2007). От друга страна, добавянето на калций като CaCO_3 и последващото понижаване на pH, което обикновено се случва в *in vitro* културите, може също да доведе до увеличаване на концентрацията на Cl. Това може да е вероятното обяснение за наличието на статистически достоверни зависимости (при концентрации от 75 и 120 mg/L Ca) за увеличаване на некротичните растения с увеличаване на времето на култивиране *in vitro*.

***Ex vitro* адаптация и аклиматизация на открито**

In vitro размножени растения, спонтанно вкоренени върху всички тествани среди, са представени на фигура 11A. Няколко хиляди *in vitro* растения са получени за една година върху оптимизираната хранителна среда. След 6 седмици *ex vitro* адаптация във фитотрон, 88% от растенията укрепнаха и достигнаха височина около 10 cm (фиг. 11D). Шестнадесет растения от 4 клона са прехвърлени на открито в *ex situ* колекцията на ИБЕИ и се наблюдава цъфтеж още през първата година (фиг. 11F). Вторичен цъфтеж също е наблюдаван през първата година, но с по-малък брой цветни кошнички. Разлики в разклоненията на стъблото и в броя на цветните кошнички се наблюдават не само между клоновете, но и между индивидите в рамките на един и същ клон (фиг. 11). Неравномерният брой цветни кошнички на растенията от един и същ клон най-вероятно се дължи на по-бързия растеж на някои индивиди в самото начало, които засенчват съседните индивиди. През втората година при първичният цъфтеж броят на цветните кошнички на растения е 328 ± 138 при най-продуктивният клон (Клон 3), което е 6 пъти повече в сравнение с първата година (фиг. 5G).



Фиг. 11. *In vitro* размножаване на растения от *T. cinerariifolium* (произход: хърватска естествена популация) **A)** *in vitro* култура на агарова среда; **B)** размножени *in vitro* клонове; **C)** *in vitro* култура в TIS; **D)** *ex vitro* адаптация в климатична камера; **E)** адаптация във фитотрон; **F)** адаптирани растения в *ex situ* колекция, първичен цъфтеж през юни 2020 г.; **G)** цъфтеж през юни 2021 г.



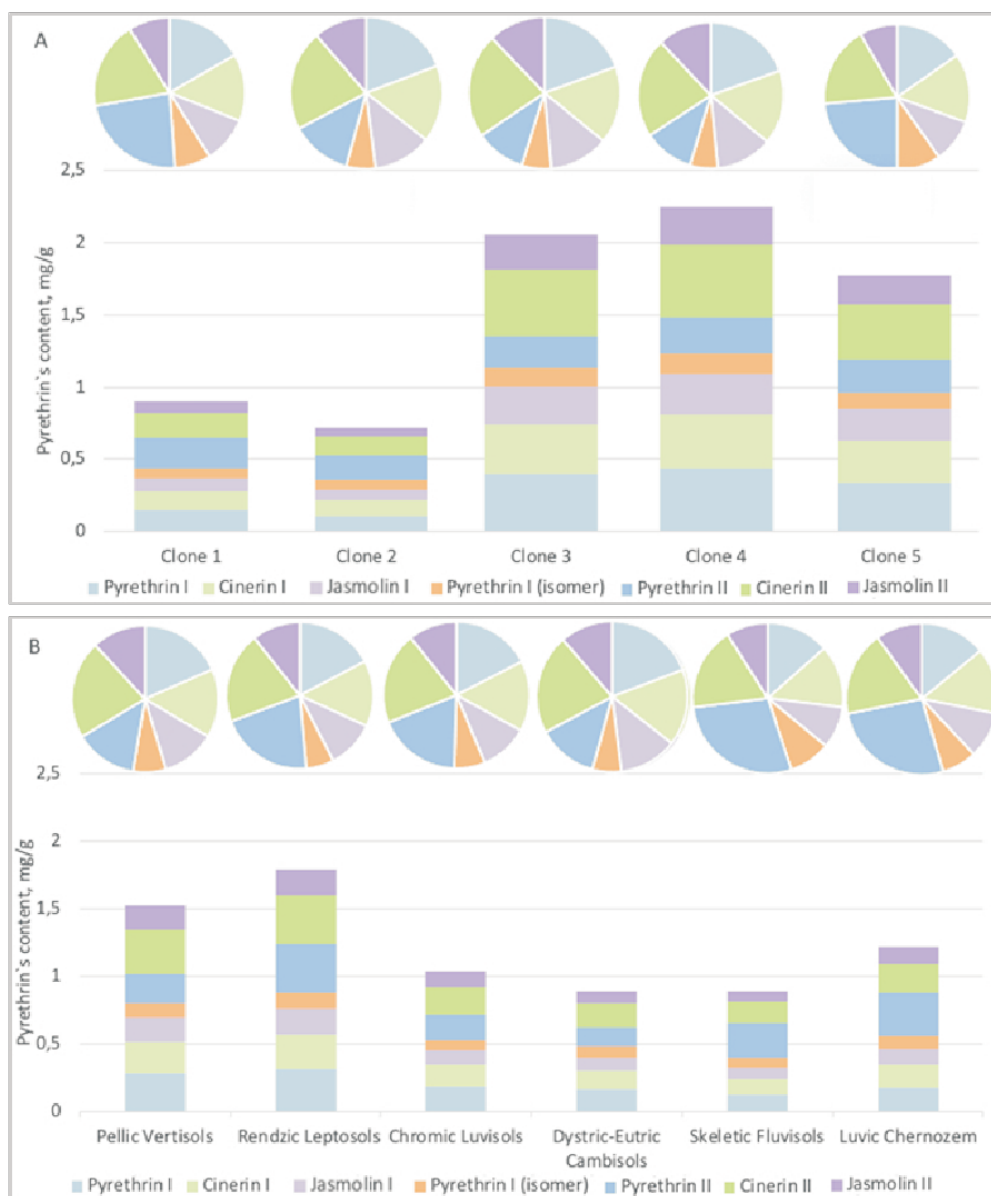
Фиг. 11. Общ брой цветни кошнички през първата година на отглеждане в *ex situ* колекцията на ИБЕИ.

Слънчевата светлина е един от ключовите фактори за оцеляването и нормалния растеж на *T. cinerariifolium*, като растенията от този вид трябва да се засаждат на по-голямо разстояние едно от друго. Wandahwa et al. (1996) също посочват значението на почвените условия за успешно култивиране на вида и за добива на съцветия, като препоръчват и схема за отглеждане при 60 cm междуредие и 30 cm отстояние вътре в реда. Отчитат се до около 10% загуба на растителен материал. Kroll (1963) препоръчва засаждане върху повдигнати лехи за да се осигури по-добра аерация на почвата и да се избегне преполиване.

5.3 Фитохимични анализи

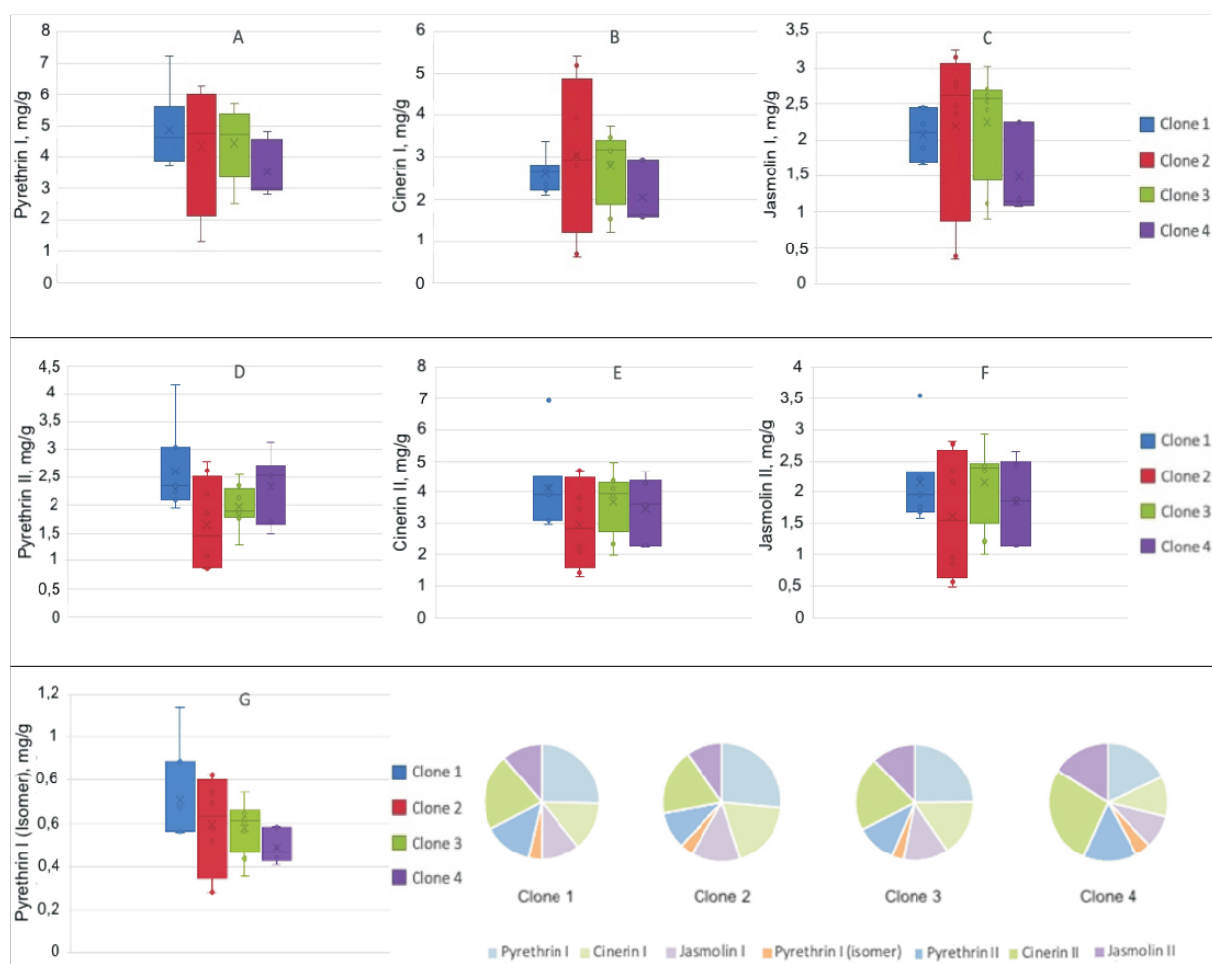
Съдържание на пиретрини в поници, *in vitro* култури и *ex vitro* адаптирани растения от клоново размножени индивиди от *T. cinerariifolium*

Всички пиретрини са идентифицирани във всички изследвани проби, включително и изомер на Пиретрин-I, като количествата и съотношенията между тях са различни. Пиретрините в *in vitro* проби и в поници са в най-малки количества (Фиг. 12), като най-голямо количество пиретрини се съдържат в цветните кошнички на Далматинският пиретрум (Jovetic, 1994, Grdisa et al., 2009). *In vitro* клоновете се различават както по общото количество на пиретрини, така и по съотношението между седемте съединения (Фиг. 12А). В клоновете с най-ниско средно съдържание на пиретрини (клон 1 и клон 2) се наблюдава по-високо съдържание на Пиретрин II в сравнение с Пиретрин I, докато в другите 3 клона Пиретрин I е в по-голямо количество в сравнение с Пиретрин II. Във всички изследвани клонове съдържанието на Цинерин I е по-ниско в сравнение с Цинерин II, а съдържанието на Ясмолин I и Ясмолин II е почти еднакво, с леко по-високи нива на Ясмолин I. Изомерът на Пиретрин I е в най-ниски концентрации в сравнение с останалите пиретрини. В пониците, растящи на различни типове почви, не се установи ясна закономерност в съотношението на Пиретрин I и Пиретрин II (Фиг. 12Б). Както и при *in vitro* културите, се установи по-високо количество на Цинерин II в сравнение с Цинерин I, а количествата на на Ясмолин I и Ясмолин II са равни. И в двете, *in vitro* култури и поници, концентрациите на изомера на Пиретрин I са до няколко пъти по-ниски от тези на Пиретрин I.



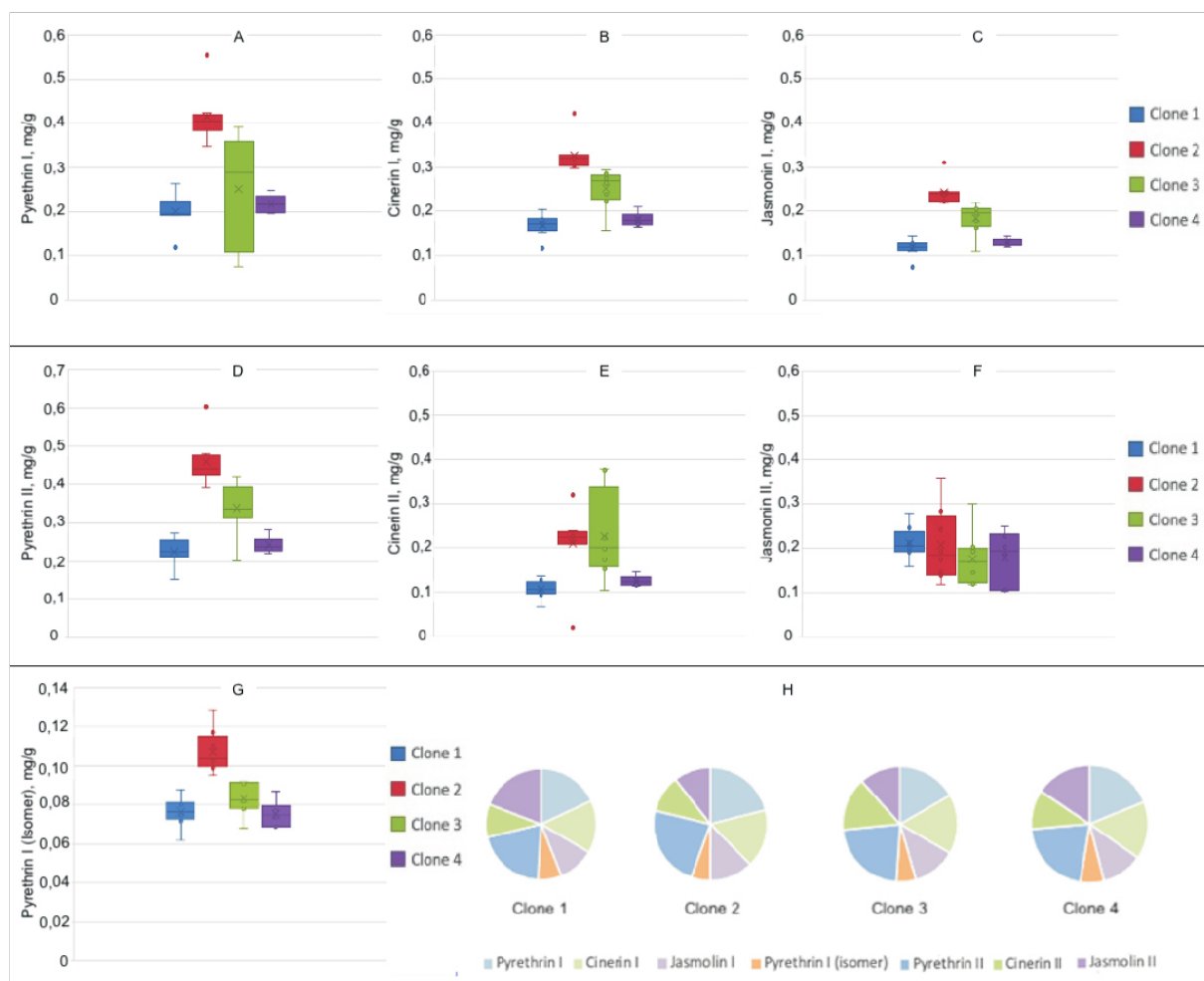
Фиг. 12. Съдържание на пиретрини и съотношение между техните седем компонента: А) в *in vitro* култури; В) в поници, растящи на различни почвени типове

В цветните кошнички, събрани през юни по време на първичния цъфтеж на растенията, адаптирани на открито, във всички клонове средното съдържание на Пиретрин I е по-високо от това на Пиретрин II (Фиг. 13). Както и при *in vitro* клоновете, количеството на Цинерин II е по-високо от това на Цинерин I, освен при клон 2. Количеството на Ясмолин I е малко по-високо в сравнение с Ясмолин II в клонове 2 и 3, докато в клонове 1 и 4 е забелязана обратната тенденция. Най-голямо вариране както при естерите на хризантемовата киселина (Пиретрини I, включително изомера на Пиретрин I), така и при естерите на пиретриновата киселина (Пиретрини II) се наблюдава в клон 2. Варирането на Пиретрини I е най-малко в клон 1, а на Пиретрини II в клон 3. Статистически значима разлика ($p < 0,05$; LSD-Post Hoc) е установена за клонове 2 и 4, относно съотношението на естера на хризантемовата киселина към същия естер на пиретриновата киселина (Фиг. 13).



Фиг. 13. Съдържание на пиретрини и съотношение между седемте компонента в цветните кошнички по време на първичен цъфтеж (юни, 2020 г.)

По време на вторичен цъфтеж нивата на изследваните вторични метаболити в цветните кошнички са в много по-ниски концентрации (Фиг. 14). Количеството на Пиретрин I е по-ниско в сравнение с Пиретрин II, количеството на Цинерин I е по-високо в сравнение с Цинерин II, като и двете тенденции се различават от тенденциите, наблюдавани при първичния цъфтеж и при *in vitro* културите. За шест от седемте определяни съединения клон 4 показва най-малко вариране, като само при Ясмолин I се установи най-малко вариране при клон 1. При повечето пиретрини има най-голямо вариране в клон 3, и само за изомера на Пиретрин I и Ясмолин II варирането е по-голямо в клон 2. Статистически значими разлики ($p < 0.05$; LSD-Post Hoc) има при съотношението на Пиретрин I/Пиретрин II при клонове 2 и 3 и между клонове 2 и 4. В съотношението на Ясмолин I/Ясмолин II статистически значими разлики ($p < 0.05$; LSD-Post Hoc) има между клонове 1 и 2; клонове 1 и 3; клонове 2 и 4. Не са установени статистически значими разлики между клоновете по отношение на съотношението на Цинерин I/Цинерин II. И в четирите клона съотношението на Пиретрин I/Пиретрин II по време на основен цъфтеж е по-голямо от 1, докато по време на вторичен цъфтеж във всички клонове съотношението на Пиретрин I/Пиретрин II е по-малко от 1. Подобна тенденция е установена и при естествени популации на вида (Grdisa et al., 2022).



Фиг. 14. Съдържание на пиретрини и съотношение между седемте компонента в цветните кошнички по време на вторичен цъфтеж (септември, 2020 г.)

Фазата цъфтеж е от ключово значение за количеството на пиретрините, като максимално количество на пиретрини се откриват на етап FS4 по Grdisa et al. (2022). Статистически разлики между клоновете са забелязани само за Пиретрин-II и изомера на Пиретрин-I през юни и за Пиретрин-I през септември ($p < 0.05$). Съотношението на Пиретрини-I/Пиретрини-II се счита за показател за качеството на пиретрин базираните продукти, а това съотношение варира широко в цветните кошнички (Head, 1973; Maciver, 1985; Morris et al., 2006). Данните, отнасящи се до надземни части на растенията, показват значително вариране не само в *in vitro* клоновете, но и в пониците, растящи на различни типове почва, като потвърждават предишни проучвания за влиянието на почвените условия върху биосинтеза на пиретрини (McDonnell et al., 1930; Grdisa et al., 2022). Сложното въздействие на биотичните и абиотичните фактори върху синтеза на пиретрините е разгледано от различни автори, като слънчевата светлина е критичен фактор за биосинтеза на пиретрини (Gnadinger, 1936). Произходът на растителния материал, климатичните и почвени условия също са съществени (Grdisa et al., 2009; McDonnell et al., 1930; Grdisa et al., 2022; Glynne-Jones, 2001). Влиянието на слънчевата светлина, както и автоматизираното поливане, може да обясни значително по-ниските нива на количеството на пиретрини по време на вторичния цъфтеж. Съдържанието на пиретрини в цветните кошнички, събрани през юни, е близко до това, съобщено за естествените популации на вида (Grdisa et al., 2022).

6. Заключение

Дисертационният труд представя завършен протокол за *in vitro* размножаване на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. с изходен материал семена. Изследвано е и влиянието на почвените характеристики върху кълняемостта на семената. Направени са сравнителни анализи на основните БАВ при *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани на открито растения от *in vitro* размножени селектирани клонове. Клоновете се различават помежду си по общото съдържание на пиретрини и по съотношението между седемте компонента, което прави биотехнологичния подход за размножаване подходящ инструмент за селекция на високопродуктивни клонове.

6.1. Основни изводи

Изводи, свързани с *in vitro* размножаването на *Tanacetum cinerariifolium* (Далматински пиретрум):

- Семената от *Tanacetum cinerariifolium* се характеризират с ниска жизненост и кълняемост (около 20%), които намаляват прогресивно с времето на съхранение и след 3-годишен период не се наблюдават жизнени семена. Най-подходящи за инициране на *in vitro* култура са прясно събрани зрели семена.
- Тяхната кълняемост при условия *in vitro* се характеризира с по-ниска кълняемост, забавено начало на кълняемостта и удължен период на покълване. Най-висока кълняемост на семената от пиретрум се наблюдава при почви тип рендзини.
- Доказано е, че в рамките на 3 до 8 субкултивирания растенията загиват вследствие на некроза и развитие на ендофитни микроорганизми. Добавянето на Medaxone в средата (в оптимална концентрация 200 mg/L), преустановява микробиалното развитие и осигурява най-висока продуктивност в продължение на 8 субкултивирания.
- На среда MS без растежни регулатори се получават добре оформени и вкоренени *in vitro* растения, като добавянето на антибиотика не се отразява на морфологичното развитие на растенията.
- Установено е, че модифицирането на основната MS среда, с увеличена концентрация на калций, добавен като CaCO₃, води до успешно намаляване на некрозата. Оптималната концентрация на добавения Ca в хранителната среда е 75 mg/L.
- Установена е разлика между десетки *in vitro* клонове (инициирани от семена и получени чрез неколккратно субкултивиране), по отношение на размножителната им способност, което дава възможност за селекция на етап *in vitro* култивиране. От оцелелите след 8-месечно култивиране 19 клон, са селектирани 4 клон, отличаващи се с най-висока продуктивност.
- Размножителният коефициент се запазва относително постоянен за 5 субкултивирания. С течение на времето се установява тенденция към намаляване на неговото вариране.
- Създадената *in vitro* система за култивиране на Далматински пиретрум (Temporary Immersion System), в култивационни съдове RITA® и с добавен Medaxone в оптимална концентрация, не води до повишаване на коефициента на размножаване на изпитаните клонове. Втвърдената с агар среда със същия състав е по-подходяща за култивиране на вида.
- При *in vitro* условия растенията се вкореняват спонтанно на всички изпитани хранителни среди, което благоприятства *ex vitro* адаптацията и води до висока оцеляемост (88% оцелели от 360). Достатъчни са 6 седмици в климатичен шкаф за укрепване и нарастване на растенията до 10 cm височина. Почти всички растения

оцеляват при следващите стъпки на адаптацията, във фитотронно помещение и в неотопляема оранжерия.

- Аклиматизацията на растенията в *ex situ* колекцията на ИБЕИ е успешна. Всички индивиди от вида цъфтят още през първия вегетационен сезон през юни, наблюдаван е и вторичен цъфтеж през септември-октомври. Установени са различия по отношение на разклоняването на стъблата и броя на цветните кошнички. През втората година цъфтежът е по-изобилен, в най-продуктивния клон са образувани средно по 328 ± 138 цветни кошнички на индивид.

Изводи, свързани с фитохимичните анализи:

- Доказано е наличието на всички пиретрини, включително и на изомера на Пиретрин-I, в изследваните проби. Тези метаболити са в малки количества както в *in vitro* растенията, така и в *in vivo* пониците. Концентрациите на изомера на Пиретрин I са до няколко пъти по-ниски в сравнение с тези на Пиретрин I.
- Установено е, че при първичния цъфтеж през юни, и при четирите клона в *ex situ* колекцията, съотношението Пиретрин I / II е по-голямо от 1, като главният компонент е Пиретрин-I (до 4.87 mg/g с коефициент на вариране 24.9%). Статистически значими разлики между клоновете ($p < 0.05$) са отбелязани само за Пиретрин-II и изомера на Пиретрин-I. Съдържанието на пиретрини в цветните кошнички е сравнимо с това, съобщено за естествени популации в Далмация.
- При вторичния цъфтеж през септември-октомври, съотношението Пиретрин I/II е по-малко от 1, което вероятно е повлияно от факторите на околната среда (по-кратко слънцегреене, както и преовлажняване на почвата в *ex situ* колекцията) и от степента на узряване на цветните кошнички по време на събирането им.
- Установени са вариации в съдържанието на пиретрини в отделните клонове, култивирани *ex situ*. За всичките 7 компонента варирането е най-голямо в клон 2. Най-малкото вариране на Пиретрини I е в клон 1, а на Пиретрини II – в клон 3. Статистически достоверни разлики при съотношението Пиретрини I / II са установени при клонове 2 и 4.

Списък на научните публикации с пълно библиографско описание

Ilinkin, V. (2019). Germination of *Tanacetum cinerariifolium* seeds on different soil types.

Ecological Engineering and Environment Protection, 2, 67-74.

<https://doi.org/10.32006/eeep.2019.2.6774>

Ilinkin, V., Yankova-Tsvetkova, E., & Stanilova, M. (2020). Germination and viability of seeds of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae). Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences, 73(7). IF 0.378, Q4; SJR 0.244, Q2;

<https://doi.org/10.7546/crabs.2020.07.09>

Ilinkin, V., Traykova, B., & Stanilova, M. (2023). *In vitro* clonal propagation of *Tanacetum cinerariifolium* and establishment of an *ex situ* collection of selected clones. BioRisk, 20, 97-114. SJR 0.297 for 2022, Q2;

<https://doi.org/10.3897/biorisk.20.97566>

Ilinkin, V., Nikolova, M., Stanilova, M., & Berkov, S. (2023). Pyrethrins profiles and contents in seedlings, *in vitro* cultures, and acclimatized plants of *Tanacetum cinerariifolium* clones (Asteraceae). Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences (Vol. 76, No. 7, pp. 1020-1027). IF 0.329 Q4; SJR 0.182 (for 2022) Q3;

<https://doi.org/10.7546/crabs.2023.07.05>

Списък на участията в научни форуми, докладващи резултати по дисертацията

1. 10th CMAPSEEC (10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries), 20-24 May, 2018, Split, Croatia, с постерен доклад на тема: “Initiation of *in vitro* clones of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae)”
автори: **Vladimir Ilinkin**, Marina Stanilova
2. 7BBC (7th Balkan Botanical Congress), 10-14 September 2018, Novi Sad, Serbia, с два постерни доклада на тема:
 - “Exudate flavonoids and pyrethrins of aerial parts of *Tanacetum cinerariifolium*”
автори: Milena Nikolova, **Vladimir Ilinkin**, Strahil Berkov;
 - “Germination and viability of seeds of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae)”
автори: **Vladimir Ilinkin**, Elina Yankova-Tsvetkova, Marina Stanilova;
3. International Scientific Conference “Kliment’s Days”, 8-9 November 2018 Sofia Faculty of Biology, Sofia University, с постерен доклад на тема: “Antibiotic in culture medium as a factor of *in vitro* propagation of *Tanacetum cinerariifolium*”
автори: **Vladimir Ilinkin**, Marina Stanilova
4. 8th International Conference of Ecologists of Montenegro 2-6 October 2019, Budva, Montenegro с постер на тема „*ex vitro* adaptation of *in vitro* propagated *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. Plants“
автори **Vladimir Ilinkin**, Boryanka Traykova, Marina Stanilova
5. Научната конференция с международно участие „100 години висше аграрно образование в България“, Стара Загора, 27-28 май 2021 г., Аграрен факултет при Тракийски университет (онлайн) – с постер на тема: „Pyrethrins in capitula of *Tanacetum cinerariifolium* plants derived from *in vitro* selected clones“
автори: **Vladimir Ilinkin**, Milena Nikolova, Boryanka Traykova, Strahil Berkov, Marina Stanilova
6. Scientific Conference “Kliment’s Days” 5th November 2021, Sofia, Sofia University, Faculty of Biology, с постер на тема: „Pyrethrins profiles and contents in *in vitro* cultures and acclimatized plants of four clones of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae)“
автори: **Vladimir Ilinkin**, Marina Stanilova, Milena Nikolova, Strahil Berkov
7. Научната конференция с международно участие „Аграрни науки и бизнес“, Стара Загора, 26-27 май 2022 г., Аграрен факултет при Тракийски университет, с постер на тема: „Establishment of *ex situ* collection of *in vitro* selected clones of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae)“
автори: Marina Stanilova, Boryanka Traykova, **Vladimir Ilinkin**
8. International Seminar of Ecology – 2022, “Actual Problems of Ecology”, 29-30 September 2022 (онлайн), с устен доклад на тема: „*in vitro* micropropagation of *Tanacetum cinerariifolium* and establishment of an *ex situ* collection of selected clones“
автори: **Vladimir Ilinkin**, Boryanka Traykova, Marina Stanilova

Справка за научните приноси на дисертацията

1. Създаден е нов ефективен протокол за *in vitro* микроразмножаване на *Tanacetum cinerariifolium* осигуряващ няколко хиляди *in vitro* растения за 1 година. (Приложение 1).
2. Установено е, че за покълване на семената от *T. cinerariifolium* най-подходящи са почвите тип рендзини.
3. Селектирани са 4 *in vitro* клона с висока размножителна способност, характеризиращи се с различна продуктивност по отношение на количеството цветни кошнички в условията на *ex situ* колекцията, което дава възможност за допълнителна селекция.
4. Потвърдено е, че в *in vitro* условия *T. cinerariifolium* синтезира всички пиретрини като са в по-ниска концентрация в сравнение с тази в цветните кошнички на добре развити растения.
5. Установено е, че при *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани в *ex situ* колекцията растения, съотношението на Пиретрин I / II е различно при някои клонове, което потвърждава влиянието на генотипа при биосинтеза на Пиретрин I и Пиретрин II и дава възможност за селекция.

Приложение 1.

Протокол за *in vitro* микроразмножаване на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.

1. Инициране на *in vitro* култура от *T. cinerariifolium* от прясно събрани зрели семена, за които е установена най-висока жизненост и кълняемост;
2. Използване на *ceftriaxone sodium* (Медаксон[®], Medochemie-Кипър), като бактериостатик в *in vitro* култури на *T. cinerariifolium* в оптимизираната му концентрация в средата (200 mg/L);
3. Добавяне на Са като СаСО₃ в оптимизираната му концентрация (75 mg/L Са) за постигане на контрол на некрозата в *in vitro* културите, в съответствие със специфичните биологични изисквания на *T. cinerariifolium*;
4. Използване на модифицирана твърда агарова MS среда (съдържаща 75 mg/L Са и Медаксон 200 mg/L), без добавени растежни регулатори, за клонално размножаване чрез директна органогенеза, със субкултивиране на всеки месец. Ефективността на процеса е повишена, благодарение на спонтанното образуване на корени;
5. *Ex vitro* адаптиране на *in vitro* получени растения при контролирани условия (субстрат Light mix Biobiss[®], France; климатичен шкаф с денонощен режим на температурата, осветлението и постепенно намаляване на относителната въздушна влажност от 90 до 60% за 6 седмици; фитотрон за 2 месеца), осигуряващи висок процент на оцеляване;
6. Аклиматизиране на растенията на открито в *ex situ* колекцията на ИБЕИ и култивиране при контролирани условия (плевене, поливане), при което се наблюдава първичен и вторичен цъфтеж още през първата година. Целият процес от инициране на *in vitro* културите до аклиматизиране на растенията при полски условия продължава една година.

Biotechnological approach for cultivation of *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. (Asteraceae)

Vladimir Metodiev Ilinkin

PhD thesis (103 pages incl. 19 tables, 30 figures, and 197 references), Sofia, 2024

Summary

Dalmatian pyrethrum, *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. (Syn. *Pyrethrum cinerariifolium* Trevir., *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.) Vis. is a perennial herb of Asteraceae family. It is a Balkan endemic distributed mainly in Croatia, also found in Albania, Bosnia and Herzegovina, and Montenegro. In Croatia, due to increased urbanization, the species is at risk of habitat loss. Phytochemical studies of *T. cinerariifolium* have led to the identification of different types of secondary metabolites. The characteristic bioactive compounds of the species are the pyrethrins, which are associated with the insecticidal action of chrysanthemum and pyrethric acids. The term “pyrethrins” refers to the six insecticidally active ingredients contained in *T. cinerariifolium*: Pyrethrins-I (Pyrethrin-I, Cinerin-I and Jasmolin-I, which are monoterpene esters of chrysanthemum acid with lethal insecticidal properties), and Pyrethrins-II (Pyrethrin-II, Cinerin-II and Jasmolin-II, monoterpene esters of pyrethric acid, with a knockdown effect on insects). Natural pyrethrins are among the most important insecticides as they possess some of the qualities of an ideal means of controlling harmful insects. They have low toxicity to mammals and other warm-blooded animals because they are easily broken down to inactive forms and are quickly cleared from the body.

The aim of the present dissertation is the experimental determination of suitable conditions for propagation of *Tanacetum cinerariifolium* using methods of plant biotechnology and the selection of promising *in vitro* clones for future testing in agriculture.

T. cinerariifolium seeds were found to be characterized by low viability and low germination, which rapidly decreased with increasing storage period. After 3 years of storage, the seeds completely lost their viability and ability to germinate. Freshly harvested seeds were best suited for initiating *in vitro* cultures. Seed germination was directly related to the physical, physicochemical and chemical characteristics of the soil. The highest percentage of germinated seeds was found in Rendzic Leptosols, followed by Luvic Chernozems and Pellic Vertisols.

The presence of unwanted bacterial microflora, a classic problem in the initiation of *in vitro* cultures and a particularly big problem with *T. cinerariifolium*, was successfully controlled by adding an antibiotic at a concentration of 200 mg/L, which did not adversely affect seed germination. since its action was bacteriostatic, it had to be added at each subcultivation, but it did not negatively affect morphogenesis. Spontaneous necrosis of *in vitro* rooted and unrooted explants was successfully minimized by adding Ca to the culture medium at a concentration of 75 ppm, in the form of CaCO₃. Temporary Immersion System (TIS) was found to be less effective for *in vitro* propagation of Dalmatian pyrethrum plants compared to agar solidified medium with added antibiotic at optimal concentration. In *in vitro* conditions, the individuals rooted spontaneously without the need for added plant growth regulators, which helped in the subsequent successful *ex vitro* adaptation and acclimatization to the conditions of the *ex situ* collection. A minimal number of dead plants was observed when using a climate chamber with strict control of temperature, lighting and relative air humidity during *ex vitro* adaptation.

Differences were found in the clones regarding the content of some pyrethrins, but also in the ratio of the corresponding esters of chrysanthemum and pyrethric acids. A difference was also found in the clone variation of some of the pyrethrins, which makes it possible to use plant biotechnologies to create agricultural crops with better predictability of yields on the one hand and with a greater possibility of creating commercial products based on the ratio of pyrethrins.