



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

Габриела Иванова Хайст

**Проучване на биосинтезата на галантамин в *Hippeastrum
papilio* (Ravenna) van Scheepen**

Автореферат

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Научна специалност: 01.06.03 “Ботаника”

Научен ръководител: проф. д-р Страхил Берков

София

2025

Дисертационният труд е разработен в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на Научния колегиум на отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси” при Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 14.04.2025 г.

Дисертационният труд е с общ обем от 93 страници, съдържа 5 таблици и 26 фигури.

Списъкът на цитираната литература съдържа 173 заглавия на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от часа в....., на открито заседание на петчленно Научно жури в състав:

Проф. д-р Марина Станилова (ИБЕИ-БАН)

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

Проф. д-р Екатерина Кожухарова (МУ)

Доц. д-р Ивайла Динчева (АБИ-ССА)

Доц. д-р Стефан Филипов (ИОХЦФ-БАН)

Съдържание

1. Увод	4
2. Литературен обзор	4
2.1. Сем. Amaryllidaceae, подсем. Amaryllidoideae	4
2.2. Род <i>Hippeastrum</i> и <i>Hippeastrum papilio</i> – общи характеристики	5
2.3. Амарилисови алкалоиди – структура, биосинтез, биологична активност	6
2.4. Фактори, повлияващи процеса на биосинтез на амарилисови алкалоиди	8
2.4.1. Плоидност	9
2.4.2. Орган-специфичен биосинтез и натрупване на алкалоиди	10
2.4.3. Макроелементи, възраст на растенията, динамика на натрупване на алкалоиди	10
2.4.4. Елиситиране	11
3. Цел и задачи	12
4. Публикации по темата (дисертацията се представя под формата на скрепени научни публикации) ¹	13
4.1. Плоидност	13
4.1.1. Morphological, cariological, and phytochemical studies of diploid and autotetraploid <i>Hippeastrum papilio</i> plants	13
4.2. Орган-специфичен биосинтез и натрупване на алкалоиди	16
4.2.1. Metabolite profiling and histochemical localization of alkaloids in <i>Hippeastrum papilio</i> (Ravena) Van Scheepen	16
4.3. Макроелементи, възраст на растенията, динамика на натрупване на алкалоиди	18
4.3.1. Dynamics of growth and galanthamine biosynthesis in <i>Hippeastrum papilio</i> (Ravena) van Sheepen hydroponic culture	18
4.4. Елиситиране	21
4.4.1. The effect of salicylic acid as an elicitor for galanthamine production in <i>Hippeastrum papilio</i> (Ravena) Van Sheepen	21

¹ 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“ главите “Материали и методи”, “Резултати” и “Обсъждане” се заместват от копия от публикациите по темата на дисертацията.

5. Заключение	22
6. Основни изводи	23
7. Приноси	24
8. Списък на научните публикации, с пълно библиографско описание и участия в научни форуми	25

1. Увод

Растенията са източник на биологично активни вещества, с огромно разнообразие и значение за човечеството, благодарение на богатата палитра от биологични активности, които притежават. На тях се базират по-голямата част от лекарствени средства, както нови – в процес на клинични изпитания, така и вече утвърдени.

Често, за производството на фармацевтични препарати се използват растения от техните естествени находища и по този начин много от тях попадат в категорията “застрашени видове“. Освен това количеството на желаното химическо съединение в растенията често варира или е незадоволително. За това темата за екологично и отговорно индустриално производство на суровини от медицински растения е все по-актуална. Ето защо от голямо значение е изследването на нови подходи, за отглеждане на медицински растения, при които се оптимизират условията за биосинтез и натрупване както на биологични активни вещества, така и на биомаса, водещо до икономически ефективни методи за индустриално производство.

2. Литературен обзор

2.1. Сем. Amaryllidaceae, подсем. Amaryllidoideae

Представителите на семейство Amaryllidaceae J.St.-Hil. са тревисти, предимно многогодишни, луковични (по-рядко коренищни), цъфтящи растения, принадлежащи към клас Едноседелни. Срещат се предимно в тропичните и субтропични райони, но също така в умерените и средиземноморски части. Към семейство Amaryllidaceae J.St.-Hil. принадлежат 75 рода и около 1600 вида (Christenhusz and Byng 2016). Представителите на това семейство се характеризират с приосновни и линейни листа. Цветовете са правилни, двуполови в сенникоцветни съцветия, рядко единични, обхванати от ципеста обвивка. Околоцветникът е с шест свободни или сраснали в тръбица листчета. Тичинките са шест. Плодник – синкарпен с долен яйчник. Плод – кутийка, рядко ягода. Семената са ендоспермични (Meerow and Snijman, 1998). Семейство Amaryllidaceae се състои от три подсемейства: Agapanthoideae, Allioideae и Amaryllidoideae (Chase et al. 2009, 2016), като се предполага, че произхождат от Африка (Meerow, 2023).

Amaryllidoideae Burnett е най-голямо от трите подсемейства. Базирайки се на молекулярни филогенетични изследвания, представителите на подсемейството допълнително се подразделят на 14 триба, които принадлежат към няколко клада (Berkov et al. 2020; Meerow, 2023). Видовете, принадлежащи към това подсемейство са геофитни (с изключение на родовете *Cryptostephanus* Welw. ex Baker, *Clivia* Lindl и някои *Scadoxus* Raf) растения, представени приблизително от 900 вида, обхващащи повече от 59 рода (Meerow et al. 1999; APG, 2009). Центровете на биоразнообразие са в Южна Америка и Южна Африка, както и средиземноморските райони. По-известни представители на подсемейството са родовете *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Lycoris*, *Hippeastrum* и др., които освен като декоративни растения, са известни също и с това, че са източник на биоактивни вещества с разнообразна структура, някои от които са с голямо медицинско и икономическо значение (Nair and van Staden, 2013).

2.2. Род *Hippeastrum* и *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepen – общи характеристики

Американският клад на подсемейство Amaryllidoideae Burnett се подразделя на Andean и Hippeastroïd кладове, като към последния принадлежи и род *Hippeastrum* (Meerow, 2023). Неговите представители са от изключително икономическо значение, популярни като декоративни растения, интензивно култивирани в Западна Европа. Към род *Hippeastrum* принадлежат 70 – 100 вида, характерни за Южна Америка (de Andrade et al. 2011), като тяхното разнообразие се открива в две основни зони – Източна Бразилия и централните и южни Анди на Перу, Боливия и Аржентина (Meerow, 2023).

Хипеаструмът е многогодишно луковично растение с плоидно ниво, вариращо между диплоидно и октаплоидно. Представителите на рода образуват между три и шест лъскави, линейни листа с дължина до 60 см и до 5 см ширина. Едно растение може да образува едно или две съцветия, като всяко съцветие се състои от две до пет (най-често четири) големи, във формата на тропмет цветове, достигащи до 20 см в диаметър. Цветовете са зигоморфни и могат да бъдат от чисто бели до брилянтно червени на цвят. Семената на *Hippeastrum* са плоски и черни (Wang et al. 2018). Създадени са повече от 300 култивара, които се експортират в световен мащаб (Wang et al. 2018).

Hippeastrum papilio (Ravenna) van Scheepen е бил открит за първи път през 1967 г. и по-късно описан като *Amaryllis papilio* от аржентинския ботаник Педро Феликс

Равенна през 1970 г. (Ravenna, 1970). През 1987 г. е взето решение *Amaryllis* да се използва само за представители на южноафриканския род. По-късно през 1997 г. група ботаници (Meerow, van Scheepen и Dutilh) прехвърлят имената на 42 вида принадлежащи към американския клад от *Amaryllis* на *Hippeastrum* (Meerow et al. 1997). За този вид са характерни цветовете, атрактивно обаяни с червени ивици (Meerow, 1988). Луковиците му достигат до 8 см в диаметър, а листата до 80 см. дължина и до 4 см. ширина.

2.3. Амарилисови алкалоиди – структура, биосинтез, биологична активност

Подсемејство Amaryllidoideae Burnett е източник на около 600 описани към момента вторични метаболити – амарилисови алкалоиди (АА), които проявяват разнообразни биологични активности, като антибактериална, антивирусна, анти-ацетилхолинестеразна, антитуморна и др. (Habartova et al. 2016; Nair et al. 2017; Berkov et al. 2020).

Според пръстеновата си система АА се класифицират на девет основни скелетни структури, с представители норбеладин, ликорин, хооликорин, кринин, хемантамин, нарциклазин, тазетин, монтанин, галантамин и разни (Berkov et al. 2020). Тази класификация непрекъснато се адаптира, поради нарастващия брой новооткрити алкалоиди.

Биосинтетичният път на амарилисовите алкалоиди не е напълно изяснен. Известно е обаче, че всички те произлизат от един общ предшественик – норбеладин. Според Desgagné-Penix (2021), биосинтетичният път на амарилисовите алкалоиди може да бъде условно разделен на пет етапа: 1) биосинтезиране на ароматните аминокиселини L-фенилаланин и L-тирозин, които са градивни единици на амарилисовите алкалоиди; 2) образуване на 3,4-дихидроксибензалдехид (3,4-DHBA) от фенилаланин; 3) основният път, който включва биосинтезирането на тирамин от тирозин и неговата кондензация с 3,4-DHBA за образуване на централен прекурсор норбеладин, както и неговото последващо O-метиране; 4) специфично фенолно свързване на 4'-O-метилнорбеладин, водещо до различни скелетни структури; и 5) крайни биосинтетични стъпки, водещи до формирането на различните амарилисови алкалоиди (Desgagné-Penix, 2021).

Известни са повече от 600 структурно различни амарилисови алкалоиди от приблизително 350 вида от подсемејство Amaryllidoideae Burnett (Berkov et al. 2020),

което означава, че по-малко от 50% от видовете, принадлежащи към това подсемейство са изследвани.

Галантамин е ацетилхолинестеразен инхибитор, единственият алкалоид от това семейство, който е одобрен от Агенцията за контрол на храните и лекарствата към САЩ (FDA) като медикамент за симптоматична терапия при болестта на Алцхаймер. Към момента повече от 55 милиона души в световен мащаб живеят с деменция, като всяка година се откриват приблизително 10 милиона нови случаи. Болестта на Алцхаймер е най-честата форма на деменция и може да допринесе за 60-70% от случаите (WHO). Това е хронично, прогресиращо, невродегенеративно разстройство, засягащо мозъка и свързаните с него функции, като паметта, мисленето и поведението. Патологичните характеристики на болестта на Алцхаймер се характеризират с отлагане на голямо количество сенилни плаки (SP) в мозъчната кора и хипокампуса, загуба на функциониращи неврони и синапси, както и дефицит на ацетилхолин. Освен това, степента на деменция е свързана със синаптична загуба между базалния преден мозък и целевите тъкани на хипокампуса и мозъчната кора, което се счита за основна причина за намаляване на паметта (Chen et al. 2022). Всички тези наблюдения водят към холинергичната хипотеза при лечението на болестта. Тя се изразява в инхибиране на ензима/ите разграждащи ацетилхолин (ацетилхолинестераза и бутирилхолинестераза) (Marucci et al. 2021), което води до повишаване на неговите нива.

Медикаментите – ацетилхолинестеразни инхибитори, използвани за симптоматична терапия при болестта на Алцхаймер, се класифицират като неспецифични, когато инхибират и двата естеразни ензима и специфични, когато инхибират само ацетилхолинестераза. Допълнително се класифицират като обратими, псевдо-необратими или необратими, въз основа на степента на ензимно инхибиране (Giacobini, 1998). Галантамин е селективен и обратим ацетилхолинестеразен инхибитор. Понастоящем се произвежда от луковиците на *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (съдържащ около 2.2 – 3.3 мг/г суха маса) (Kreh et. al. 2002; Marco-Contelles et al. 2006; Lubbe et al. 2011) в Централна и Западна Европа, от листата на *Leucojum aestivum* (съдържанието на галантамин варира от следи до около 5.0 мг/г суха маса) (Berkov et al. 2009a) в източна Европа и от луковиците на вида *Lycoris* (съдържание на галантамин от 0.2 до 5.0 мг/г суха маса) (Chang, 2015) в Китай.

Друг алкалоид биосинтезиран от представители на подсемейство Amaryllidoideae е хемантамин, който се изследва интензивно, поради способността му да преодолява резистентността на туморните клетки към апоптоза, което го определя като потенциален нов антитуморен медикамент (Pellegrino et al. 2018). Изследванията за неговата биосинтеза в различни растителни източници би било в интерес за евентуално бъдещо получаване.

De Andrade et al. (2011) изследват луковици и листа от *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepren и установяват високо съдържание на галантамин. По-късно Guo et al. (2016) потвърждават тези наблюдения и установяват чрез газ хроматографски-мас спектрометрични (ГХ-МС) анализи, че галантамин и хемантамин са основни компоненти в алкалоидната смес на луковици *Hippeastrum papilio*.

По предварителни данни съдържанието на галантамин в листа на *Hippeastrum papilio* е установено 0.54% в сухата маса (Berkov et al. 2022). Освен това, *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepren е без период на покой (за разлика от другите растения, от които се получава галантамин), нараства бързо и е сред най-големите представители от род *Hippeastrum* по размер на луковица и листна маса (Berkov et al. 2022). Тези данни сочат, че *Hippeastrum papilio* би могъл да бъде потенциален нов източник на галантамин, но липсват такива по отношение на разпределението му в органите и тъканите на растението, динамиката му на натрупване и влиянието на различни фактори върху процеса на биосинтез.

2.4. Фактори, повлияващи процеса на биосинтез на амарилисови алкалоиди

При добиването на биологично активни вещества (БАВ) за индустриални цели се предпочита култивиране на медицинските растения, с което се осигурява устойчивост и предвидимост на получаването на суровина от една страна и намаляване на антропогенния натиск върху естествените им находища, от друга. Първа стъпка при въвеждането в култура на медицински растения е селектирането на генотипове с подобрени физиологични и фитохимични качества. Фитохимичният състав на важни за индустрията растителни видове е непостоянен и може да бъде повлияван от редица фактори – генетическа предопределеност (генотип, сорт, плоидно ниво), физиологични (орган, зрялост, възраст) и агрономически (хранителен разтвор, стресиращ фактор). Тези фактори могат да бъдат групирани най-общо като биотични (напр. плоидно ниво,

физиологични) и абиотични (агрономически), и могат да бъдат използвани както за повлияване биосинтеза на биоактивни вещества, така и за повишаване на биомасата на растенията.

2.4.1. Плоидност

Полиплоидията се изразява с присъствието на три или повече пълни комплекта хромозоми и се определя като една от движещите сили в еволюционния процес при диворастящите растения. Според произхода си, полиплоидите се класифицират като автополиплоиди и алополиплоиди (Stebbins, 1971).

Освен че се среща естествено при много растителни видове, автополиплоидията може да бъде и изкуствено предизвикана, с цел подобряване на техните морфологични и фитохимични качества (Sattler et al. 2016; Madani et al. 2021). Индуцирането на полиплоиди *in vitro* най-често се предизвиква с помощта на антимитотични вещества, като колхицин.

Дублиране на целия геном може да предизвика значителни промени в генната експресия, като свързаните с това ефекти могат значително да варират между видовете. Удвояването на генетичния материал е свързано с увеличаване размера на клетките, което води до промени в размера на техните органи и структури. От друга страна, автополиплоидията може да предизвика забавен растеж, който от своя страна да доведе до намаляване на биомасата.

По отношение на фитохимичния профил, в много случаи се наблюдават разлики между диплоиди и автотетраплоиди (Iannicelli et al. 2020). Полиплоидизирането може да повлияе както първичния, така и вторичния метаболизъм при растенията. Като цяло, при автополиплоидни растения се наблюдава повишен биосинтез на метаболити, но този ефект би могъл да варира между различните растителни видове (Madani et al. 2021).

2.4.2. Орган-специфичен биосинтез и натрупване на алкалоиди

Основна функция на алкалоидите е да предпазват растенията от тревопасни животни, насекоми и вредители (Houghton et al., 2006), като се биосинтезират, транспортират и натрупват в специфични растителни тъкани и органи. Мястото на биосинтез (орган, клетъчна структура) може да се различава от мястото им на натрупване и тези два процеса не са универсални за растителните видове. Например, тропановите алкалоиди и никотин се биосинтезират в близост до кореновия връх, но се натрупват във вакуолите на листата и корените (Facchini, 2001).

По отношение на амарилисовите алкалоиди, в литературата се срещат данни описващи орган-специфичната генна експресия на известните към момента ензими, част от първоначалните стъпки от биосинтетичния им път. Наблюдаваните резултати сочат, че първоначалните стъпки от биосинтетичния път на амарисовите алкалоиди започват в луковици, но не се споменава точно в коя част. Луковиците са изградени от морфологично и физиологично различни части. Вътрешността им, например, е изградена от млади, активно растящи листа. В проучване в *Narcissus* с изотопно белязани прекурсори се установява, че най-младите листа, намиращи се още в централната част на луковиците, са място за активен биосинтез на амарилисови алкалоиди (Mehta et al. 2024) .

Акумулирането на алкалоиди в растенията и тяхното органно разпределение би могло да се установи чрез метаболитни анализи. Хистологични изследвания от своя страна, разкриват тъканната и клетъчна локализация на алкалоидите.

2.4.3. Макроеlementи, възраст на растенията, динамика на натрупване на алкалоиди

Според литературни данни, процесите на биосинтез на първични и вторични метаболити, както и натрупването на биомаса при растенията, могат да бъдат повлияни от количеството на макроеlementите в почвата или в хранителните разтвори (Abdolzadeh et al. 2006; Ullrich et al. 2017). Имайки предвид присъствието на азот в алкалоидните молекули, се предполага, че по-високите нива на този елемент в хранителни разтвори, биха повлияли положително техния биосинтез.

Биосинтезът и натрупването както на БАВ, така и на биомаса, са свързани с етапите на развитие (Hazrati et al. 2024) и възраст на растенията (Mu et al. 2010). Ето защо е

необходимо да се установи, в кой момент от развитието на дадено растение се синтезира в най-висока степен желано активно вещество.

2.4.4. Елисителиране

Широко прилагана техника за стимулиране биосинтезирането на БАВ в растенията е елисителирането. По дефиниция, като елисители се определят вещества от различен произход, които в ниски концентрации предизвикват промени в растенията, изразяващи се с активацията на биосинтез на вторични метаболити, свързана със защитната реакция на растенията (Vasconsuelo and Boland, 2007). Според своя произход, елисители могат да се класифицират като биотични и абиотични (химически вещества и физически фактори), както и фитохормони (жасмонати, салицилова киселина и др.).

Салициловата киселина по природа е фенолно съединение – фитохормон, вземащ участие в редица физиологични процеси в растенията, свързани с техния растеж и развитие, като фотосинтеза, транспирация, регулация на устицата и др. Освен това допринася за адаптацията на растенията към биотични и абиотични фактори от околната среда (Khan et al. 2015). В редица изследвания се установява, че екзогенното прилагане на салицилова киселина активира експресията на гени, водещи до биосинтезата на вторични метаболити, като фенолни съединения, алкалоиди и др. (Gondor et al. 2016; Quing-Yan et al. 2019; Ramos-Sotelo and Figueroa-Pérez, 2023).

Въпреки, че ефекта на елисителиране върху натрупването на галантамин в *in vitro* условия е изследван (Mu et al. 2009; Schumann et al. 2013), не се откриват данни за проучвания, проведени с амарилисови растения като хидропонни култури. Различни фактори повлияват ефекта на елисителиране. Сред тях на първо място е типът елиситор, но също така важни параметри са време на третиране, концентрация, етап на растеж на растението, начин на прилагане и др. Подходът да се установят най-добрите параметри на елисителиране е емпиричен (Vasconsuelo and Boland 2007).

От направения литературен обзор става ясно, че *Hippeastrum papilio* биосинтезира значително количество галантамин, но липсват задълбочени количествени изследвания, относно съдържанието му в различните органи и динамиката на неговото натрупване. Данни за влиянието на фактори като плоидност, възраст, макроеlementи и елисители

върху процесите на биосинтез и натрупване на галантамин в *Hippeastrum papilio* също не се откриват в литературата.

3. Цел и задачи

3.1. Цел

Основна цел на дисертационния труд е да се изследва влиянието на фактори, повлияващи биосинтеза на галантамин като генотип, възраст, макроеlementи и елиситори в *H. papilio*. Също цел е и изследването на динамиката на натрупване на биомаса и галантамин за оптимизиране на получаването на алкалоида от този растителен вид.

3.2. Задачи

За постигане на поставените изследователски цели са планирани следните задачи:

1. Анализ на съдържанието на галантамин в диплоидни и автотетраплоидни растения *H. papilio*.
2. Изследване орган-, и тъканно специфичните биосинтез и натрупване на галантамин в различни части на *H. papilio*.
3. Изследване влиянието на различни концентрации на макроеlementите азот, калий и калций върху биосинтеза на галантамин и натрупването на биомаса в корени, луковици и листа на 0-, 1- и 2-годишни хидропонно отглеждани растения *H. papilio*.
4. Изследване влиянието на салициловата киселина като елиситор, в различни концентрации и време на третиране, върху процеса на биосинтез на галантамин в хидропонни култури *H. papilio*.

4. Публикации по темата

4.1.1. Морфологични, кариологични и фитохимични изследвания на диплоидни и автотетраплоидни растения *Hippeastrum papilio*

Материали и методи

Диплоидни растения от *Hippeastrum papilio* ($2n = 2x = 22$) са били предоставени от Ludwig and Co BV, Нидерландия (<https://www.ludwigandco.nl>) и използвани за индукция на автотетраплоиди по протокол по Berkov и Philipov (2002). Растенията, с размери на устицата по-големи от тези на контролните диплоидни растения, са били въведени за *in vitro* размножаване, както е описано в Berkov и колеги (2022b). *In vitro* култури от контролни диплоидни и третирани с колхицин растения, са били поддържани повече от 6 години преди настоящото изследване. *In vitro* диплоидни и автотетраплоидни растения бяха аклиматизирани върху перлит като хидропонни култури в климатична стая. Три месеца по-късно, аклиматизиранияте растения бяха поставени на аеропонна система върху глинени камъчета.

Броят на хромозомите бе определен в метафазни клетки от върховете на корените на хидропонни култури от диплоидни и автотетраплоидни растения *H. papilio*. Хромозомните и кариотипни параметри, като съотношение на хромозомните рамена, центромерен индекс и обща дължина на хромозомите, бяха анализирани със софтуерна програма IdeoKar 1.3. Размерът на генома и нивото на пloidност бяха допълнително потвърдени чрез поточен цитометър.

Бяха анализирани размерите (дължина и ширина) на устицата от десет диплоидни и десет автотетраплоидни индивида. Също така, морфологичните характеристики на десет диплоидни и десет автотетраплоидни индивида бяха измерени непосредствено преди фитохимичните анализи.

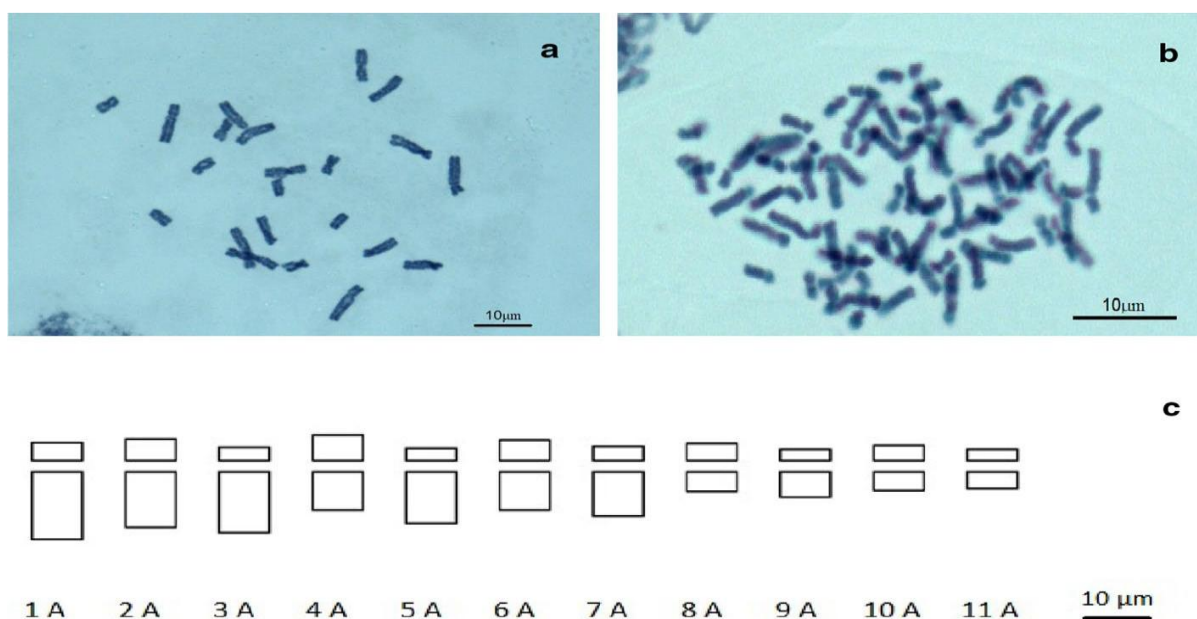
Пробоподготовката за ГХ-МС анализи на листна маса от десет диплоидни и десет автотетраплоидни растения бе според Berkov и колеги (2011). Бе изготвена калибрационна крива за количествено определяне на галантамин, използвайки пет концентрации и кодеин като вътрешен стандарт.

За наличието на значителни разлики в морфологичните и фитохимични характеристики между диплоидните и автотетраплоидни растения, бе използван

статистически метод two-sample Student's t тест при ниво на значимост $p < 0.05$. Анализите на основните компоненти (PCA) бяха извършени с помощта на статистическа софтуерна програма Minitab Statistical Software v. 19 (Minitab LLC, State College, PA, САЩ) (безплатна пробна версия).

Резултати

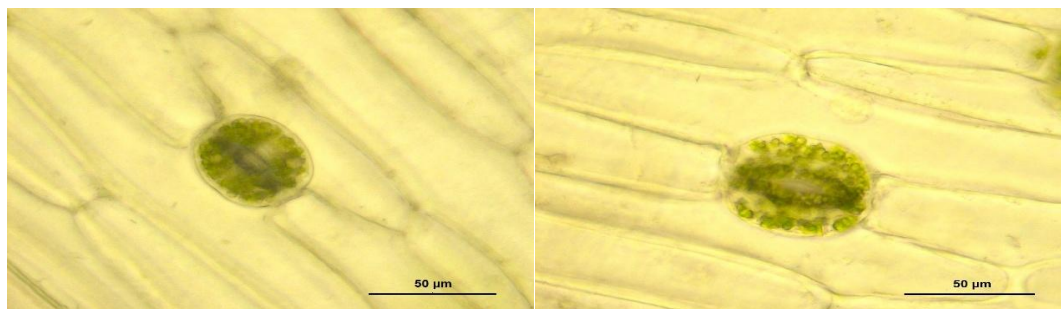
Цитологичните изследвания на коренови меристемни клетки потвърдиха броя на хромозомите на диплоидни ($2n = 2x = 22$, Фиг. 1a) и автотетраплоидни ($2n = 4x = 44$, Фиг. 1b) *H. rapilio* растения. Кариотипът на диплоидните растения се състои от единадесет двойки хромозоми (Фиг. 1c). Според разположението на центромера, хромозомите се разделят на три групи – четири двойки (4, 8, 10 и 11) хромозоми са метацентрични (m), четири двойки (2, 6, 7 и 9) са субметацентрични (sm) и три двойки (1, 3 и 5) са субтерминални (st) (Фиг. 1).



Фигура 1. Снимки на митотични метафази в коренови меристематични клетки *H. rapilio*, оцветени с хематоксилин на Gomori на диплоидните (a) и автотетраплоидните (b) растения. Идиограма (c) на диплоиден набор от хромозоми, конструирана със софтуерна програма IdeoKar 1.3.

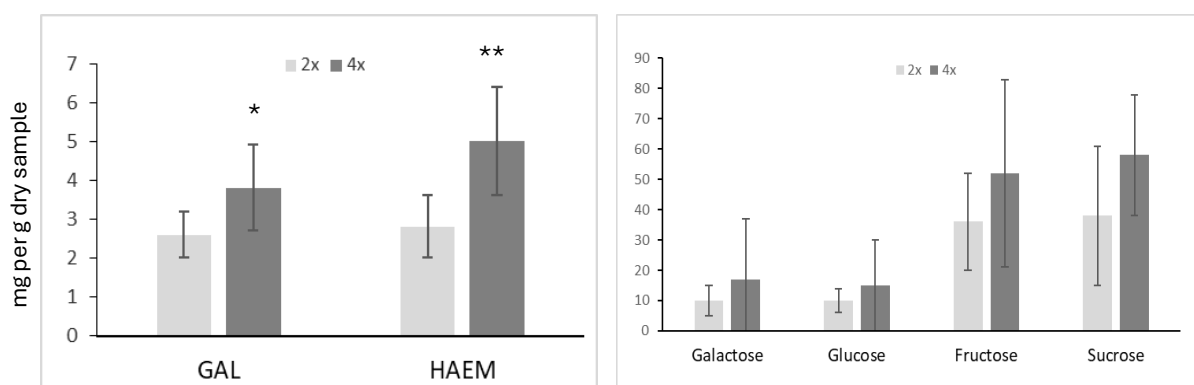
Two-sample Student's t тест установи наличието на значителни разлики ($p < 0.05$; $p < 0.01$) в дължината и ширината на устицата между диплоидни и автотетраплоидни *H. rapilio* растения (Фиг. 2). Автотетраплоидните растения *H. rapilio* показаха значително по-бавен растеж в сравнение с диплоидните, което бе наблюдавано от теглото на

растението, свежото тегло на листата, броя на листата и диаметъра на луковичката. В резултат на това, биомасата на автотетраплоидите беше значително намалена в сравнение с диплоидните растения.



Фигура 2. Устица от абаксиална страна на листа на диплоидни (ляво) и автотетраплоидни (дясно) растения *H. rapilio*, при 60 × увеличение.

Около 64 метаболита бяха открити чрез ГХ-МС анализ, като тридесет и три от тях бяха идентифицирани в метанолни екстракти от листна маса на диплоидни и автотетраплоидни растения *H. rapilio*. Въпреки че, метаболитните профили на диплоидните и автотетраплоидни растения бяха сходни, полиплоидните растения биосинтезират значително по-високи количества галантамин и хемантамин (49.7% и 80.1%), в сравнение с диплоидните. Освен това, бе наблюдавана тенденция на по-високо съдържание на захари при автотетраплоидните растения (Фиг. 3).



Фигура 3. Съдържание на галантамин (GAL) и хемантамин (HAEM) (ляво) и основни захариди (дясно) (mg/g суха маса) в метанолови екстракти от листа на диплоидни (2x) и автотетраплоидни (4x) *H. rapilio* хидропонни култури. Данните са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (n = 10). Значителна разлика според Student *t*-тест при ниво на значимост **p* < 0.05; ***p* < 0.01

4.2.1. Метаболитно профилиране и хистохимична локализация на алкалоиди в *Hippeastrum papilio* (Ravena) van Scheepen

Материали и методи

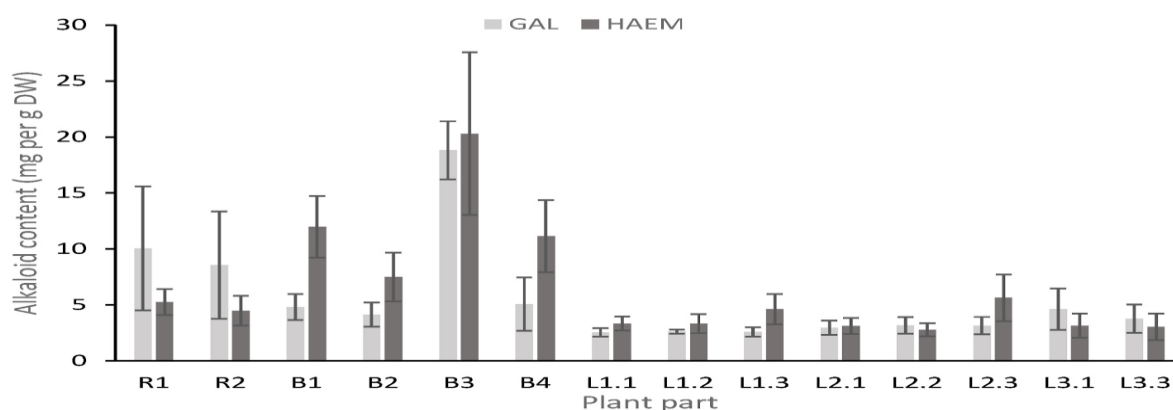
Растения *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen, получени *in vitro* и аклиматизирани *ex vitro*, както е описано в Berkov и колеги (2022 a,b) бяха отглеждани в оранжерия на Институт по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания (ИБЕИ) към БАН. Пет растения бяха избрани на случаен принцип за настоящото изследване през лятото на втората година на култивиране. Хистохимичните анализи бяха изпълнени според Gomez и колеги (2019). Пробоподготовката на растителните проби за ГХ-МС анализи бе според Berkov и колеги (2011). За количествено определяне на галантамин и хемантамин бе изготвена калибрационна крива с пет концентрации и кодеин като вътрешен стандарт.

Резултати

Хистохимичните анализи показаха, че алкалоиди се наблюдават във всички изследвани растителни органи (корен, луковици и листа) *H. papilio*, като се откриват в проводящите снопчета, вакуоли, ядра и вътреклетъчни пространства. В средната част на листата, както и в луковици, алкалоиди бяха наблюдавани и в междуклетъчните пространства.

Данните от ГХ-МС анализи потвърдиха наличието на алкалоиди във всички изследвани органи *H. papilio*, като най-богати на галантамин и хемантамин бяха подземните органи (луковици и корен), по-конкретно централната част на луковичите (18.8 ± 2.6 mg/g and 20.3 ± 7.3 mg/g суха маса) (Фиг. 4). Освен това, чрез ГХ-МС анализ на флоема се установи, че алкалоидите съставляват 49.3% от растителната проба, като основни алкалоиди бяха галантамин, хемантамин и 11 β -хидроксигалантамин.

Около 82 метаболитни съединения бяха наблюдавани при ГХ-МС метаболитно профилиране на различни части на корен, луковици и листа *H. papilio* в полярна, аполярна и фенолна фракция (Таблица 1). Най-високи количества и брой съединения бяха открити в средните и млади листа, което показва, че са най-метаболитно активни. Също така най-високи нива на аминокиселините фенилаланин и тирамин, прекурсори на АА, бяха открити във върховете на младите (L3.1) и средни листа (L2.1).



Фигура 4. Съдържание на галантамин (GAL) и хемантамин (HAEM) (mg/g суха маса) в екстракти от различни растителни части на хидропонни култури *H. papilio*. Данните са показани като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$). B1, външна част луковица; B2 средна част луковица; B3 вътрешна част луковица; B4, базална част на луковица; L1.1., върхна част най-външен лист; L1.2. средната част най-външен лист; L1.3., основа на най-външния лист; L2.1., върхна част среден лист; L2.2., средна част среден лист; L2.3. основна част среден лист; L3.1., върхна част най-млад лист; L3.3., основна част най-млад лист; R1, върхна част на корен; R2, основна част на корен.

Compound group	Radix		Bulb				Outermost leaf			Middle leaf			Young leaf	
	peak	base	outer	middle	inner	basal	peak	middle	base	peak	middle	base	peak	base
	R1	R2	B1	B2	B3	B4	L1.1	L1.2	L1.3	L2.1	L2.2	L2.3	L3.1	L3.3
Organic acids	2.26	0.36	0.48	0.56	0.23	0.09	0.42	0.54	0.63	0.63	0.68	1.10	1.61	1.35
Fatty acids	8.66	3.17	0.53	1.20	1.83	8.01	5.04	3.59	2.43	5.70	5.72	2.62	6.88	2.34
Sterols	nd*	Nd	0.02	0.06	nd	Nd	0.14	0.11	0.15	0.11	0.10	0.07	0.09	0.06
Sugars	18.72	18.65	319.77	255.54	36.14	10.74	22.72	15.24	137.05	43.91	13.40	70.60	6.02	25.94
Amino acids	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd	1.67	1.04	1.54	34.25	5.64	18.38	23.98	19.65
Free phenolic acids	nd	Nd	0.15	0.13	nd	nd	0.13	1.00	0.97	2.52	0.93	0.45	0.88	0.39
Conjugated phenolic acids	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	0.03	0.05	0.01	0.08	0.03	0.02	0.06	0.05
Gалантамин	10.05	8.55	4.80	4.13	18.82	5.07	2.55	2.61	2.59	2.95	3.17	3.14	4.62	3.75
Хаемантамин	5.25	4.48	11.97	7.49	20.30	11.14	3.33	3.32	4.62	3.11	2.76	5.64	3.14	3.04

*nd - not detected.

Таблица 1. Разпределение на първични и вторични метаболити в *Hippeastrum papilio*, изразено като mg/g суха маса (средни стойности, $n = 5$).

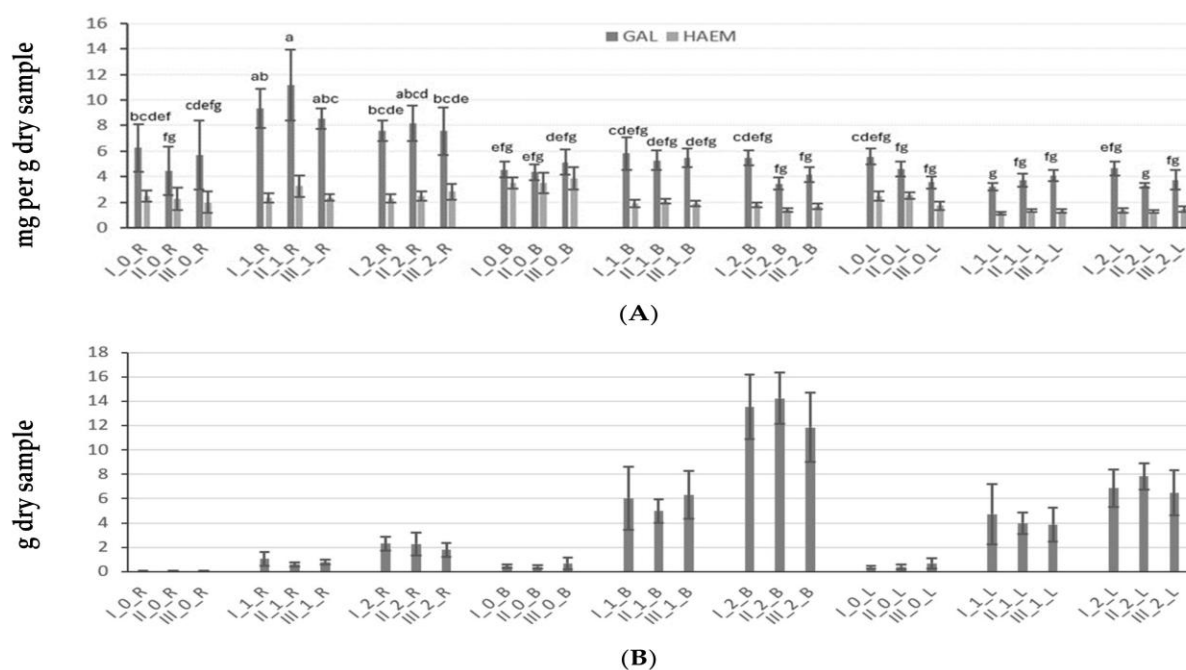
4.3.1. Динамика на растеж и биосинтез на галантамин в *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Sheepen хидропонни култури

Материали и методи

Експериментите бяха проведени с растения *H. papilio* от три различни възрасти – 0 за 4-месечни растения получени *in vitro* и *ex vitro*, аклиматизирани в перлит, както е описано в Berkov и колеги (2022b), възраст 1 за растения, отглеждани в почва за един вегетационен сезон и възраст 2 за растения, отглеждани в почва за два вегетационни сезона. Луковици от растения на възраст 1 и 2 години, както и растителния материал, използван за индуциране на *in vitro* култури, бяха предоставени от Ludwig and Co BV, Budel, Нидерландия. Растенията бяха отглеждани в хидропонна система в пластмасови щайги (40 cm × 60 cm) с перлит за растения на възраст 0 и глинени камъчета за растения на възраст 1 и 2 години в продължение на 6 месеца (от началото на май 2022 г. до края на октомври 2022 г.) в оранжерия на ИБЕИ. През първите три месеца растенията бяха отглеждани с основен хранителен разтвор (Fertilizer I), описан в рецептурните формулировки предложени от Kroggel и Kubota (2018). През следващите три месеца растенията бяха отглеждани с три различни хранителни разтвора (Fertilizer I, Fertilizer II и Fertilizer III). Fertilizer II бе формулиран с 33% повече N, 143% повече K и 11% повече Ca, докато Fertilizer III бе с 111% повече N, 143% повече K и 39% повече Ca, в сравнение с Fertilizer I. Всеки месец 5 растения от всяка възраст и хранителен разтвор бяха събирани на случаен принцип. Впоследствие, всяко растение бе разделено на корени, луковица и листа, като тяхното свежо (FW) и сухо тегло (DW) бе документирано. ГХ-МС анализите бяха изработени според Berkov и колеги (2011). Количественото определяне на галантамин бе според Berkov и колеги (2011) с калибрационна крива с осем концентрации за галантамин и кодеин като вътрешен стандарт. Статистическите анализи бяха извършени с помощта на Minitab Statistical Software v. 19 (Minitab LLC, State College, PA, САЩ) (безплатна пробна версия). Методът one-way ANOVA бе използван за изследване ефекта на един фактор, multiple linear regression за анализ ефекта на повече от един фактор. И двата метода бяха последвани от Tukey тест при ниво на значимост $p < 0.05$. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$).

Резултати

Ефекта на различните хранителни разтвори върху съдържанието на галантамин и хемантамин в корен, луковица и листа в три различни възрасти на растения *H. papilio* бе изследван (Фиг. 5А). Допълнително бе анализиран ефекта на хранителните разтвори между растения от една и съща възраст и орган. Съдържанието на галантамин в луковици (5.5 ± 0.6 mg/g суха маса) и листа (4.6 ± 0.6 mg/g суха маса) на растения от 2-годишна възраст, отглеждани с Fertilizer I бе значително по-високо, в сравнение с другите два хранителни разтвори (Фиг. 5А; допълнителни материали). Резултатите показваха, че различните хранителни разтвори не повлияват натрупването на биомаса в корен, луковици и листа *H. papilio* (Фиг. 5В).



Фигура 5. Количество галантамин и хемантамин (А) и биомаса (В) в края на вегетационен период (октомври) в корени (R), луковици (B) и листа (L) на *H. papilio* от три различни възрасти (0, 1 и 2), третирани с три различни хранителни разтвори (Fertilizer I, II и III). Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$). Различните букви показват статистически значими разлики според метода на Multiple linear regression, последван от Tukey тест при ниво на значимост $p < 0.05$.

Добивът на галантамин за квадратен метър в края на вегетационния период бе изчислен въз основа на броя растения за квадратен метър към сухото тегло на растителните органи, и съдържанието на галантамин в тях (Таблица 2В). Най-висок

добив на галантамин от луковици ($3816 \pm 988 \text{ mg/m}^2$, значителна разлика) и цели растения ($6249 \pm 1487 \text{ mg/m}^2$) бе открит в растения на възраст 2, както и цели растения на възраст 1, отгледани с Fertilizer I ($6191 \pm 3275 \text{ mg/m}^2$) (Таблица 2В).

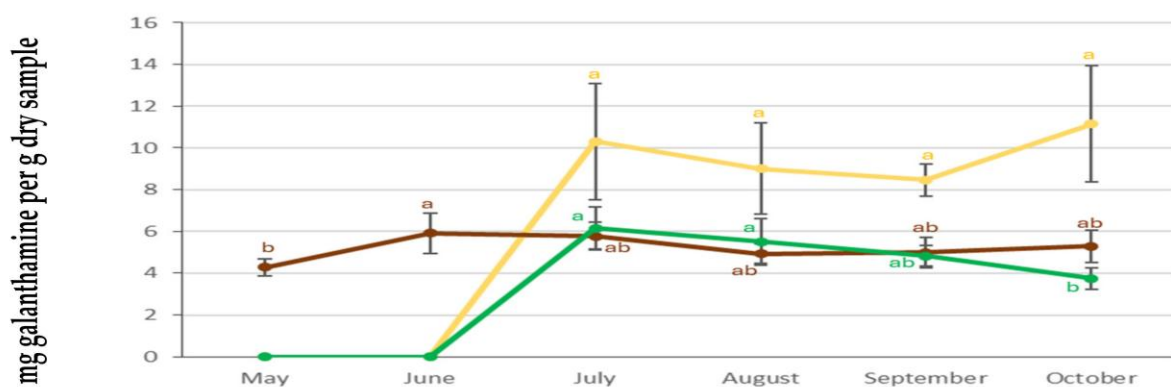
(A)	Age 0			Age 1			Age 2		
Fertilizer	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Roots	25 ± 8	17 ± 8	21 ± 11	110 ± 58	64 ± 18	83 ± 23	116 ± 28	114 ± 47	90 ± 27
Bulbs	142 ± 49	125 ± 52	214 ± 149	624 ± 266	520 ± 99	655 ± 207	677 ± 132	712 ± 105	592 ± 142
Leaves	109 ± 36	125 ± 54	218 ± 134	492 ± 91	417 ± 91	403 ± 143	343 ± 76	392 ± 54	324 ± 92
Total	275 ± 92	267 ± 114	453 ± 292	1226 ± 580	1000 ± 196	1141 ± 368	1136 ± 227	1217 ± 136	1006 ± 235

(B)	Age 0			Age 1			Age 2		
Fertilizer	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Roots	167 ± 96	82 ± 75	113 ± 40	983 ± 405	665 ± 136	722 ± 240	874 ± 313	869 ± 254	622 ± 55
Bulbs	623 ± 214	566 ± 286	1043 ± 708	3650 ± 2213	2704 ± 670	3510 ± 1160	3816 ± 988 *	2386 ± 270	2452 ± 462
Leaves	598 ± 162	470 ± 387	759 ± 554	1558 ± 759	1469 ± 235	1567 ± 647	1559 ± 248	1268 ± 354	1125 ± 215
Total	1388 ± 440	1118 ± 691	1915 ± 1269	6191 ± 3275	4838 ± 724	5799 ± 1884	6249 ± 1487	4523 ± 559	4198 ± 631

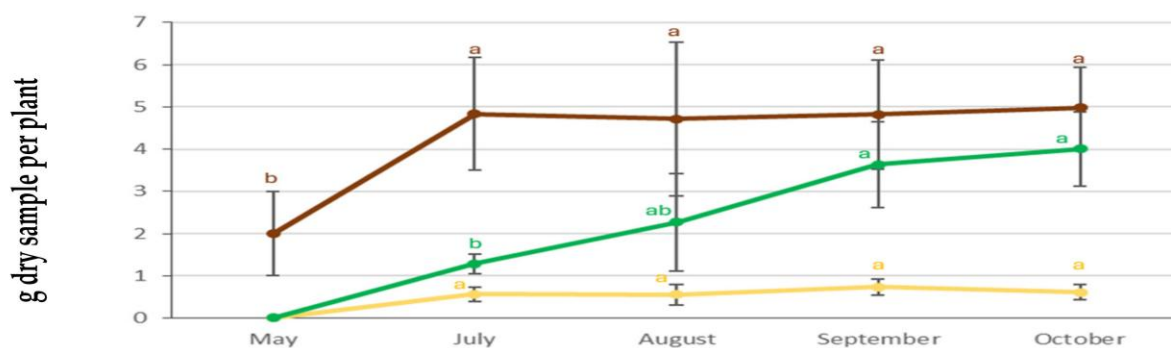
* represents a significant difference between the different fertilizers tested among the same organ and age at a significant level of $p < 0.05$.

Таблица 2. Добив на биомаса (g суха маса/ m^2) (A) и галантамин (mg/m^2) (B) в корен, луковици и листа, както и цели растения *H. papilio* хидропонни култури, представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$).

Динамика на натрупване на галантамин и биомаса в корен, луковици и листа *H. papilio* на възраст 1 от началото на май до края на октомври е представена на Фиг. 6.



(A)



(B)

Фигура 6. Динамика на натрупване на галантамин (А) и биомаса (В) в корени (жълт), луковици (кафяв) и листа (зелен) *H. papilio* хидропонни култури на възраст 1, отгледани с Fertilizer I. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$). Различните букви представят значителна разлика между различните месеци, тествани при един и същи орган, при значително ниво на $p < 0.05$.

Резултатите показаха, че луковиците, преди началото на вегетационния период имат най-ниско съдържание на галантамин (4.3 ± 0.4 mg/g суха маса). Месец след началото на растежа, съдържанието на галантамин достига най-високи стойности (5.9 ± 1.0 mg/g суха маса), последван от спад до септември. В края на вегетационния период – през октомври, съдържанието на галантамин в луковиците бе отново завишено до 5.3 ± 0.8 mg/g суха маса (Фиг. 6А). Най-високо съдържание на галантамин (6.2 ± 1.0 mg/g суха маса) в листата бе наблюдавано два месеца след начало на култивиране, като постепенно намалява до края на вегетационния сезон, достигайки 3.7 ± 0.5 mg/g суха маса. Динамика на съдържание на галантамин в корените следват тези на луковиците, достигайки най-високо ниво в края на вегетационния сезон (11.2 ± 2.8 mg/g суха маса).

Тенденцията на натрупването на биомаса в луковиците бе подобна на тази при натрупването на галантамин (Фиг. 6В). Най-интензивен растеж и натрупване на биомаса при листата бе наблюдаван през август-септември. Подобно на луковиците, интензивен растеж при корените бе наблюдаван през първите месеци на отглеждане и тяхната биомаса остава относително постоянна до края на вегетационния сезон.

4.4.1. Ефект на салицилова киселина като елиситор за натрупване на галантамин в *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepen хидропонни култури

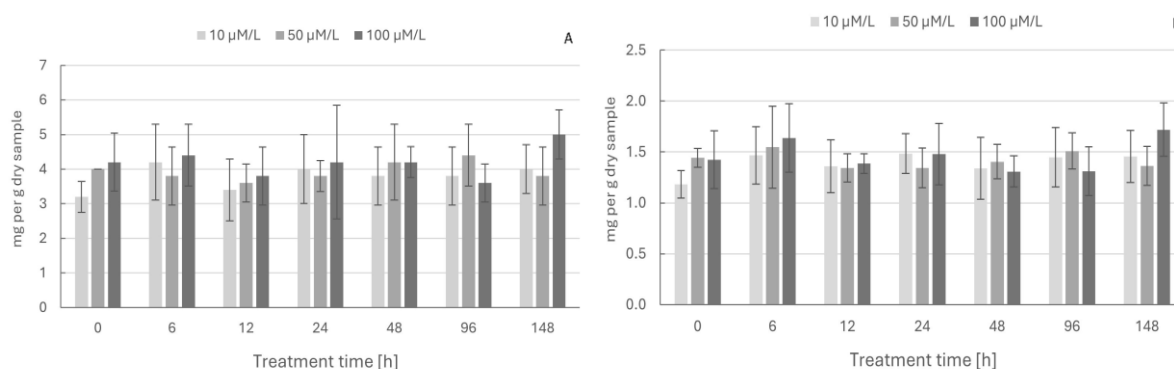
Материали и методи

Едногодишни растения *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen бяха предоставени от Ludwig and Co BV, Нидерландия (<https://www.ludwigandco.nl>) и отглеждани в оранжерията на ИБЕИ като хидропонни култури от април до ноември. Растенията бяха култивирани с основен хранителен разтвор, описан в рецептурните формулировки, предложени от Kroggel и Kubota. Преди елиситорът салицилова киселина (SA) да бъде добавен към хранителния разтвор, пет растения бяха събрани като контрола (0 h), след което ефекта на три концентрации SA (10, 50 и 100 μ M/L) бяха анализирани във времеви точки – 6, 12, 24, 48, 96 и 148 часа, като бяха събирани по пет

растения от концентрация за последващ фитохимичен анализ. ГХ-МС анализите бяха изработени според Berkov и колеги (2011). Калибрационна крива с осем концентрации за галантамин и кодеин като вътрешен стандарт бе изготвена за количествено определяне на галантамин.

Резултати

Бе анализиран ефекта на три различни концентрации салицилова киселина (10, 50 и 100 $\mu\text{M/L}$) в различни времеви точки върху биосинтеза на галантамин и хемантамин. Резултатите показаха, че най-високата приложена концентрация на SA (100 $\mu\text{M/L}$) е най-ефективна за стимулиране биосинтеза на галантамин, което води до 19% увеличение, в сравнение с нетретираните растения (от 4.2 ± 0.8 до 5.0 ± 0.7 mg/g суха маса) (Фиг. 7A). Подобна тенденция бе наблюдавана и по отношение натрупването на НАЕМ (от 1.4 ± 0.3 до 1.7 ± 0.3 mg/g суха маса) (Фиг. 7B).



Фигура 7. Съдържание на галантамин (A) и хемантамин (B), изразено като mg/g суха маса в листа на хидропонно отглеждани растения *H. papilio*, третирани с три различни концентрации на салицилова киселина (10, 50 и 100 $\mu\text{M/L}$), измерено в различни времеви точки (0, 6, 12, 24, 48, 96, 148 h). Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($n = 5$).

5. Заключение

Дисертационният труд проследява процеса на биосинтез и натрупване на амарилисовите алкалоиди галантамин и хемантамин под влиянието на биотични (плоидност) и абиотични (състав на хранителни разтвори и елиситор) фактори в различни органи и възрасти на хидропонно отглеждани *Hippeastrum papilio* растения. Бе установено, че различните фактори повлияват по различен начин процеса на биосинтез

на вторични метаболити и натрупването на биомаса. Полиплоидията при *Hippeastrum papilio* повлиява положително биосинтеза на алкалоиди, но оказва негативен ефект върху натрупването на биомаса. Също така бе установена органната и клетъчна локализация на алкалоидите при *Hippeastrum papilio*. Галантамин и хемантамин се откриват във всички изследвани растителни органи (корен, луковица и листа), но се натрупват основно в луковиците – по-специално в тяхната централна част, съставена от млади листа. По отношение на клетъчната локализация на алкалоидите, те се откриват в проводящите снопчета и други тъкани, което показва, че протича активен транспорт между различните органи на тези важни вторични метаболити. Освен това бе проследена динамиката на натрупване както на алкалоиди, така и на биомаса в различните органи на едногодишни растения *Hippeastrum papilio* през един вегетативен период. Бе наблюдавано, че активен биосинтез протича в началото на вегетативния период. Бе установено също, че по-високата концентрация на елементите азот, калий и калций в хранителни разтвори на хидропонно отглеждани *Hippeastrum papilio* растения не оказват положителен ефект върху натрупването както на алкалоиди, така и на биомаса. Също така бе анализиран добива на галантамин за квадратен метър от 1- и 2-годишни хидропонно отглеждани *Hippeastrum papilio* растения. Резултатите показаха, че 1-годишните растения произвеждат за квадратен метър сравнимо количество галантамин, колкото и 2-годишните растения. Изследванията от елиситиране с различни концентрации салицилова киселина също показаха, че това е обещаващ подход за увеличаване биосинтезата на галантамин в *Hippeastrum papilio*.

6. Основни изводи

- Размерът на устицата е индикатор за определяне на полиплоидното ниво при *Hippeastrum papilio*.
- Полиплоидизирането на *Hippeastrum papilio* повлиява неговия първичен и вторичен метаболизъм. Автотетраплоидните растения, от една страна биосинтезират значително по-високи нива на галантамин и хемантамин, но от друга страна, техният растеж е забавен.

➤ Хистологичните и метаболитни изследвания в корен, луковици и листа на *Hippeastrum papilio* водят към предположението, че процесът на биосинтез на алкалоиди се случва в надземните му органи.

➤ Процесите на биосинтез и натрупване на алкалоиди при *Hippeastrum papilio* са орган- и тъканно специфични процеси. Алкалоиди се откриват в корен, луковици и листа. Централната част на луковиците на *Hippeastrum papilio* се наблюдава като най-богата на галантамин и хемантамин.

➤ Основните клетъчни структури, където се наблюдават алкалоиди, са проводящи сночета, вакуоли, вътре - и междуклетъчни пространства. Освен това алкалоиди бяха открити и във флоем, което показва транспортиране на тези биоактивни вещества между различните растителни органи.

➤ Различните концентрации на макроелементите азот, калий и калций в хранителните разтвори на хидропонно отглеждани растения *Hippeastrum papilio*, повлияват по различен начин процесите на биосинтез и натрупване на галантамин в различните органи и възраст, но не оказват ефект върху натрупването на биомаса. Луковици на 2-годишни растения *Hippeastrum papilio* акумулират значително по-високо количество галантамин, когато растенията са отглеждани с разтвор – с основни нива на макроелементите, в сравнение с тези отглеждани с по-концентрирани разтвори.

➤ Най-високо количество галантамин в корени, луковици и листа на 1-годишни *Hippeastrum papilio* растения се наблюдава в началото на един вегетативен сезон. Въпреки това, краят на вегетативния период е оптимален за екстракция на галантамин, поради натрупаната биомаса.

➤ *Hippeastrum papilio* растения, отглеждани като хидропонни култури на възраст 1 година акумулират сравнимо количество галантамин за кв.м., с тези на възраст 2 години.

➤ Луковиците се открояват като основен орган на натрупване на галантамин (53–61%). Въпреки това, листата (25-30%) и коренът (13-19%) също биха могли да бъдат използвани за екстракция на това съединение.

➤ Салициловата киселина може да се използва като елиситор и проявява положителен ефект върху процеса на биосинтез на галантамин в хидропонно отглеждани *Hippeastrum papilio* растения.

7. Приноси

За първи път е изследвана хромозомната морфология на диплоидни растения *Hippeastrum papilio*, установявайки формулата на неговия кариотип.

За първи път се правят сравнителни анализи на първичните и вторични метаболити в диплоидни и автополиплоидни растения *Hippeastrum papilio*.

За първи път се правят хистологични изследвания в *Hippeastrum papilio*, установявайки тъканната локализация на алкалоиди.

За първи път се анализира количествено галантамин и хемантамин в различни растителни органи и части на *Hippeastrum papilio*, както и техния метаболитен профил.

За първи път се изследва влиянието на различни концентрации хранителни разтвори върху натрупването на галантамин и хемантамин в три възрасти, в корен, луковици и листа от *Hippeastrum papilio*.

За първи път се прави анализ на продуктивността (изразен в гр. за единица площ) на *Hippeastrum papilio* като източник на галантамин.

За първи път се тестват елиситори в хидропонни култури от амарилисови растения за стимулиране на биосинтезата на БАВ.

8. Списък на научните публикации с пълно библиографско описание и цитиранията по тях

Публикация „Morphological, cariological, and phytochemical studies of diploid and autotetraploid *Hippeastrum papilio* plants“ – Gabriela Haist, Boriana Sidjimova, Vladimir Vladimirov, Liliya Georgieva, Milena Nikolova, Jaume Bastida, Strahil Berkov, Planta Vol. 257, No 51, 2023

IF 3.6, Q1, SJR 0.944

<https://doi.org/10.1007/s00425-023-04084-5>

Равнява се на 32 машинописни страници.

Докторантът е първи автор.

Цитирания:

Yuanfu, L., Xinyu, W., Siyuan, L., Yan, Z., Ruihan, H., Chen, S. (2025). Analysis of changes in morphological characters and drought resistance of tetraploid *P. alba*. Preprint <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-5751567/v1>.

Zhang J., Cheng C., Xiao F., Zhang X., Zhang C., Zhao Y., Xu J., Zhang S., Wang, X. (2024). Effects of ploidy level on leaf morphology, stomata, and anatomical structure of *Hibiscus syriacus* L. BMC Plant Biology. 24, 1133, <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-024-05778-y>.

Zhang, X., Zheng, Z., Wang, J., Li, Y., Gao, Y., Li, L., Pang, Y., Bian, F. (2024). In vitro induction of tetraploids and their phenotypic and transcriptome analysis in *Glehnia littoralis*. BMC Plant Biology. 24, 439, <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-024-05154-w>.

Volante, A., Savona, M., Ruffoni, B. (2025). Biotechnology Approaches in *Hippeastrum* spp. Herb.: Current Status and Perspectives for Breeding. In: Wani, M.A., Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. (eds) Breeding of Ornamental Crops: Bulbous Flowers. Advances in Plant Breeding Strategies, vol 5. Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-77900-8_11

Публикация „Metabolite profiling and histochemical localization of alkaloids in *Hippeastrum papilio* (Ravena) van Scheepen“ – Gabriela Haist, Boriana Sidjimova, Elina Yankova-Tsvetkova, Milena Nikolova, Rumen Denev, Ivanka Semerdjieva, Jaume Bastida, Strahil Berkov, Journal of Plant Physiology, Vol. 296, p. 154223, 2024
IF 4.0, Q1, SJR 0.947
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154223>

Равнява се на 33 машинописни страници.

Докторантът е първи автор.

Цитирания:

Trujillo Chacón, L. M., Leiva, H., Rojas, J. M., Zapata, C., Castro, D., Domínguez, M., Osorio, E. (2024). Histochemical localization and cytotoxic potential of alkaloids in *Phaedranassa lehmannii*. Plants. 13(22):3251, <http://dx.doi.org/10.3390/plants13223251>.

Liyanage, N. S., Awwad, F., Goncalves dos Santos, K. C., Jayawardena, T. U., Merindol, N., Desgagne-Penix, I. (2024). Navigating Amaryllidaceae alkaloids: bridging gaps and charting biosynthetic territories - A Comprehensive Review. Journal of Experimental Botany. 76(1), <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erae187>.

Публикация „Dynamics of Growth and Galanthamine Biosynthesis in *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Sheepen Hydroponic Culture“ – Gabriela Haist, Borjana Sidjimova, Rumen Denev, Jaume Bastida and Strahil Berkov, Agronomy, Vol. 14, No 9, p. 2115, 2024
IF 2.0, Q1, SJR 0.588

<https://doi.org/10.3390/agronomy14092115>

Равнява се на 13 машинописни страници.

Докторантът е първи автор.

Публикация „The effect of salicylic acid as an elicitor for galanthamine production in *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Sheepen hydroponic cultures“ – Gabriela Haist, Boriana Sidjimova, Rumen Denev, Strahil Berkov, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, Tome 78, No 1, 2025
IF 0.3, Q3, SJR 0.16

<http://dx.doi.org/10.7546/CRABS.2025.01.08>

Равнява се на 8 машинописни страници.

Докторантът е първи автор.

Списък на участията в научни форуми, отразяващи изследванията по дисертацията

1. Haist G., Denev R., Ivanova I., Michaleva N., Berkova P., Sidjimova B., Nikolova M., Berkov S. 2021. Metabolite profiling of *Hippeastrum papilio* : a new source of galanthamine. 1st International Conference on Botany and Mycology. 25 – 26 October, Sofia, Bulgaria. Постерен доклад.

2. Haist G., Sidjimova B., Georgieva L., Nikolova M., Bastida J., Berkov S. 2023. Phytochemical studies of diploid and autotetraploid *Hippeastrum papilio* plants. 5th International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf (ICNPU). 30 May – 2 June, Sts. Constantine and Helena resort, Bulgaria. Постерен доклад.

Study of galantamine biosynthesis in *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepen

Gabriela Haist

Ph.D. Dissertation

Plants are a source of biologically active substances of great diversity and importance to humanity, thanks to their rich palette of biological activities. Often, medicinal plants are used from their natural habitats for the production of pharmaceutical products, and thus many of them fall into the category of "endangered species". In addition, the amount of the desired chemical compound in plants often varies or is unsatisfactory. For this reason, the topic of environmentally friendly and responsible industrial production of raw materials from medicinal plants is increasingly relevant. Therefore, it is of great importance to study new approaches to growing medicinal plants, in which the conditions for biosynthesis and accumulation of both biologically active substances and biomass are optimized, leading to cost-effective methods for industrial production.

The Amaryllidaceae family consists of three subfamilies: Agapanthoideae, Allioideae, and Amaryllidoideae, and is thought to have originated in Africa. Amaryllidoideae Burnett is the largest of the three subfamilies. Based on molecular phylogenetic studies, the subfamily is further subdivided into 14 tribes, which belong to several clades. Better known representatives of the subfamily are the genera *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Lycoris*, *Hippeastrum*, etc., which, in addition to being ornamental plants, are also known as sources of bioactive substances – Amaryllidaceae alkaloids (AAs), some of which are of great medical and economic importance. Galantamine is an acetylcholinesterase inhibitor, the only alkaloid in this family that is approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as a medication for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. Currently, more than 55 million people worldwide live with dementia, with approximately 10 million new cases diagnosed each year.

For industrial production of biologically active substances (BAS), cultivation of medicinal plants is preferred, which ensures sustainability and predictability of the raw material on the one hand and reduces anthropogenic pressure on their natural habitats, on the other. The phytochemical composition of plant species is unstable and can be influenced by several factors – genetic predisposition (genotype, ploidy level), physiological (organ, maturity, age), and agronomic (nutrient solution, stress factor).

Hippeastrum papilio biosynthesizes a significant amount of galantamine, but there are no detailed quantitative studies on its content in different organs and the dynamics of its accumulation. Data on the influence of factors such as ploidy, age, macronutrients, and elicitors on the processes of galantamine biosynthesis and accumulation in *Hippeastrum papilio* are also not found in the literature.

The effect of ploidy on galanthamine biosynthesis, as well as the morphological and cytological traits of *Hippeastrum papilio* plants was studied. The results revealed significant differences between diploid and autotetraploid *H. papilio* plants. The length and width of stomata in autotetraploids were larger than those observed in the diploid leaves. The biomass of one-year-old autotetraploid *H. papilio* plants was reduced by 53.99% for the plants' fresh weight. The content of galanthamine and haemanthamine was found to be 49.73% and 80.10%, respectively, higher in the leaves of autotetraploids, compared to the diploid ones.

The biosynthesis and accumulation of alkaloids are tissue – and organ-specific processes. Histochemical localization of alkaloids in *H. papilio*'s plant organs revealed their presence in all studied samples. Alkaloids were observed in vascular bundles, vacuoles, and intracellular spaces, while in other plant tissues and structures, they depend on the plant organ. The bulbs and roots showed higher alkaloid content compared to the leaf parts. The highest alkaloid content was found in the inner bulb part.

The effect of three different Fertilizers on three different ages of roots, bulbs, and leaves of *H. papilio* showed that extra fertilizing with N, K, and Ca does not positively influence galanthamine and biomass accumulation. Despite the lower biomass accumulation per individual, the plants grown for two seasons (age 1) showed a comparable galanthamine yield (per square meter) at the end of vegetation to those grown for three seasons (age 2) due to their higher density of cultivation. The dynamics of alkaloid and biomass accumulation, studied in plants from age 1 during the vegetation season, showed that the highest galanthamine content in the plant organs is at the beginning of vegetation.

In order to enhance the galanthamine and haemanthamine accumulation in *H. papilio*, elicitation with salicylic acid (SA) was tested in one-year-old hydroponic cultures. Treatment with 100 $\mu\text{M/L}$ SA during 148 h enhanced GAL biosynthesis by 19% compared to the initial level. A similar trend was observed for HAEM accumulation.