

Обобщен О Т Ч Е Т

ЗА

**НАУЧНО- ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА РАБОТА ПРОВЕДЕНА ПРИ
ИЗПЪЛНЕНИЕТО
НА**

ДОГОВОР КП-06-Н26-6/13.12.2018

ФИНАНСИРАН ОТ ФОНДА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

НА

**ТЕМА: “ РЕПРОДУКТИВЕН ПОТЕНЦИАЛ, МЕТАБОЛИТЕН И ГЕНЕТИЧЕН
ПРОФИЛ В УСЛОВИЯ *IN SITU* И *EX SITU* НА ВИДОВЕ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ
ОТ БЪЛГАРСКАТА ФЛОРА С РЕСУРСЕН ДЕФИЦИТ – НАУЧНА ОСНОВА ЗА
ТЯХНОТО ОТГЛЕЖДАНЕ В КУЛТУРА”**

ДЕКЕМВРИ 2018 – ФЕВРУАРИ 2023 ГОД.

**РЪКОВОДИТЕЛ НА ПРОЕКТА: ДОЦ. Д-Р ЕЛИНА ПЕТРОВА ЯНКОВА-ЦВЕТКОВА
/ИБЕИ, БАН/**

С О Ф И Я

2023

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Анотация.....	3
2. Научен колектив	4
3. Обосновка.....	5
4. Резултати от изпълнение на проекта.....	7
4.1. Работен пакет 1. <i>In situ</i> и <i>ex situ</i> изследвания и събиране на изходен материал:.....	7
4.2. Работен пакет 2. Фитохимична характеристика и метаболомика.....	19
4.3. Работен пакет 3. Ембриологични изследвания.....	23
4.4. Работен пакет 4. Генетични изследвания и течна цитометрия.....	27
4.5. Работен пакет 5. Растителни биотехнологии и хидропонни ултури.....	30
5. Обобщение.....	37

ТЕМА: “ РЕПРОДУКТИВЕН ПОТЕНЦИАЛ, МЕТАБОЛИТЕН И ГЕНЕТИЧЕН ПРОФИЛ В УСЛОВИЯ IN SITU И EX SITU НА ВИДОВЕ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ОТ БЪЛГАРСКАТА ФЛОРА С РЕСУРСЕН ДЕФИЦИТ – НАУЧНА ОСНОВА ЗА ТЯХНОТО ОТГЛЕЖДАНЕ В КУЛТУРА”

1. АНОТАЦИЯ

Цел: Настоящият проект има за основна стратегическа цел култивиране с оглед осигуряване на суровина и опазване на естествените популации на четири ценни лечебни растения с ресурсен дефицит и консервационна стойност за българската флора, а именно: *Alkanna tinctoria*, *Helichrysum arenarium*, *Primula veris*, *Arctostaphylos uva-ursi*.

Оперативните цели на проекта са: мониторинг на естествените популации на целевите видове; установяване на състоянието им чрез основни техни характеристики: размер, обилие, експлоатационни запаси и др.; разкриване типа на размножаване, реализацията на репродуктивния им потенциал при конкретни условия на средата (включително и стресови); определяне съдържанието на БАВ, генетичен и метаболитен профил; установяване на оптималните условия за ефективно микроразмножаване; създаване и поддържане на *ex situ* колекции за съхранение на ценен генетичен материал, необходим за бъдещи дейности свързани с опазване на целевите видове чрез култивиране.

Изследователска стратегия: За осъществяване на тези цели се прилага комплекс от изследвания, които включват: Мониторинг на популациите на базата на „Методика за мониторинг на висши растения”, „Методика за оценка състоянието на висши растения” на Изпълнителната агенция по околна среда (ИАОС); Ембриологични изследвания за определяне начина на размножаване и репродуктивния потенциал на целевите видове; Разработването на протоколи за *in vitro* размножаване и аклиматизация в естествени условия на целевите видове чрез прилагане на различни биотехнологични подходи: клонално микроразмножаване, соматична ембриогенеза, hairy root култури, хидропонно култивиране; Фитохимични изследвания за определяне съдържанието на основни БАВ чрез хроматографски /GC-MS, TLC, HPLC/ и спектрофотометрични методи; Генетични анализи с приложение на ДНК-маркери и Течна цитометрия за оценка на генетичното разнообразие и размера на генома на целевите видове; Създаване на *ex situ* колекции с растения от естествените находища и от *in vitro* и хидропонно размножени растения.

Очаквани резултати: На базата на това комплексно изследване ще бъдат получени фундаментални научни данни за избраните слабо проучени лечебни видове с консервационно значение за българската флора. Те ще допълнят биологичната характеристика на целевите видове и ще създадат основа за бъдещото им отглеждане в култура.

2. НАУЧЕН КОЛЕКТИВ

Доц. д-р Елина Петрова Янкова-Цветкова /ИБЕИ, БАН/ - ръководител на договора

Участващи институции

Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН /ИБЕИ, БАН/-

Базова организация:

Проф. д-р Страхил Христов Берков /ИБЕИ, БАН/

Проф. д-р Петър Желев Стоянов /Лесотехнически Университет/

Доц. д-р Антонина Асенова Виткова /ИБЕИ, БАН/

Доц. д-р Петка Димитрова Юрукова-Грънчарова /ИБЕИ, БАН/

Проф. д-р Марина Иванова Станилова /ИБЕИ, БАН/

Доц. д-р Милена Тихомирова Николова /ИБЕИ, БАН/

Доц. д-р Ина Йосифова Анева /ИБЕИ, БАН/

Доц. д-р Стоян Стефанов Стоянов /ИБЕИ, БАН/

Доц. д-р Владимир Димитров Владимиров /ИБЕИ, БАН/

Гл.ас.д-р Мария Иванова Петкова /ИФРГ, БАН/

Докторант Ася Кожухарова /ИБЕИ, БАН/

Докторант Владимир Илинкин /ИБЕИ, БАН/

Биолог Татяна Тихомирова Стефанова /ИБЕИ, БАН/

Биолог Розалия Божидарова Николова /ИБЕИ, БАН/

Химик Марина Николова Димитрова /ИБЕИ, БАН/

Аграрен Университет, Пловдив – Партньорска организация

Доц. д-р Иванка Божкова Семерджиева /Аграрен Университет/

Проф. д-р Вълчо Демиров Желязков /Държавен Университет Орегон САЩ/

3. ОБОСНОВКА

Обект на изследване в настоящия проект са следните лечебни растения: *Alkanna tinctoria*, *Helichrysum arenarium*, *Primula veris* и *Arctostaphylos uva-ursi*. При подбора на целевите видове се имаше предвид това, че те са ценни, търсени лечебни растения, с консервационна значимост за българската флора, под специален режим на ползване, съгласно ежегодна Заповед на Министъра на околната среда и водите, за специалния режим на опазване и ползване на лечебните растения. Избраните целеви видове са слабо или изобщо непроучвани по отношение на техния репродуктивен потенциал и възможностите им за *ex situ* размножаване. Изясняването на репродуктивните възможности е ключов момент при опазване на естествените им популации. Единственият път за устойчивото ползване и опазване на тези ресурси за българската флора е чрез разработване на подходи за *ex situ* отглеждане на целевите видове, което изисква комплексен подход на изследване. В тази връзка, в настоящия проект се предлага провеждане на интердисциплинарно изследване, което досега не е правено с целевите видове.

Кратка характеристика на предложените за изследване видове:

***Alkanna tinctoria* (L.) Tausch (Синя айважива) (сем. Boraginaceae)** е лечебен вид, включен в Червена книга на Р България (Евстатиева 2015) и в Червения списък на висшите растения (Petrova & Vladimirov 2009) в категорията „**застрашен вид**“, и в Приложение 3 на Закона за биологичното разнообразие /ЗБР 2002/ за видовете, забранени за събиране от естествените им местообитания.

Разпространение в България: Известни са няколко малочислени находища в равнинните и предпланинските части на Южна България и едно находище в Дунавската равнина. Растението се размножава се чрез семена и се среща по каменисти и пясъкливи места от 100 до 600 м над.в.

***Primula veris* L. (Лечебна иглика) (сем. Primulaceae)** е защитен вид, съгласно ЗБР. Видът е включен в Приложение 4 на ЗБР и в Списъка на видовете лечебни растения под специален режим на опазване и ползване, на основание на Закона за лечебните растения /ЗЛР/ (чл.10, ал.1,2 и 3). *Вид с определяни от МОСВ годишно допустими за събиране количества билки за стопански цели от естествените им находища, извън териториите на националните паркове.* Разрешени за събиране от естествените находища са надземните части и корените на игликата, като ежегодно МОСВ определя квоти за тяхното събиране.

Разпространение в България: Главно в дъбовия пояс в цялата страна, но най-често популациите на вида са с ниско обилие и малка площ и неравномерно разпространение на растенията. По-големите по площ популации се използват активно за събирането на цветоносни стъбла и корени за стопански цели. Видът се размножава семенно, като образува многобойни семена и вегетативно чрез коренови издънки. В следствие на ежегодното събирането на растителни материали за фармацевтични цели, част от стопанско значимите находища на игликата са изтощени.

Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (Мечо грозде) (сем. Ericaceae) е защитен вид съгласно ЗБР. Видът е включен в Приложение 4 на ЗБР и в Списъка на видовете лечебни растения под специален режим на опазване и ползване на основание на ЗЛР (чл.10, ал. 1, 2 и 3). **Видът е забранен за събиране за стопански цели от естествените находища на територията на цялата страна.** Включен е в Списъка на видовете лечебни растения в приложенията на Конвенцията по международната търговия със застрашени видове от дивата фауна и флора.

Разпространение в България: В почти всички планини от 1000-2500 м н.в. на кафяви горски, планинско – ливадни и почви рендзини с различна киселинност, строеж и структура. Рсте по каменисти и скалисти места, като образува стелещи се и изправени стъбла дълги 20-150 см, размножава се със семена. Поради активното събиране на растението в миналото и настъпилите климатични промени голяма част от популациите му са с намалена площ.

Helichrysum arenarium (L.) Moench (Жълт смил) (сем. Asteraceae) е защитен вид съгласно ЗБР, включен в Приложение 4 на ЗБР /2007/ и в Списъка на видовете лечебни растения под специален режим на опазване и ползване на основание на ЗЛР (чл. 10, ал. 1, 2 и 3). **Видът е забранен за събиране за стопански цели от естествените находища на територията на цялата страна.**

Разпространение в България: Расте по песъкливи места, разпръснато край морето, в Североизточна България, Източна Стара планина и Горнотракийската низина от 0 до 400 м н.в. Размножава се семенно и вегетативно.

4. РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ПРОЕКТА

Поради комплексния характер на изследването, проведените изследвания са групирани в отделни работни пакети:

4.1. Работен пакет 1. *In situ* и *ex situ* изследвания и събиране на изходен материал:

РП 1 е съставен от учени от двете партниращи си научни организации, които са експерти в областта на растителното разнообразие, мониторинга и ресурсната оценка на консервационно значими, редки, лечебни и ароматни растения и създаване на *ex situ* колекции от тях: доц. д-р А.Виткова, доц. д-р Стоян Стоянов /ИБЕИ-БАН/, доц д-р Иванка Семерджиева, Проф. Вълчо Желязков /Аграрен Университет Пловдив/.

4.1.1. Изследователски методи и техники

- Проучване хорологията на целевите видове, чрез събиране на информация за естествените им находища от българските хербариуми: ИБЕИ-БАН (SOM), Биологичен факултет на СУ (SO), Аграрен университет, Пловдив (SOA), данни от литературни източници.
 - Провеждане на теренни проучвания на територията на страната.
 - Локализиране на избрани популации на целевите видове чрез маршрутен и стационарен метод и с помощта на GPS устройства.
 - Изследване състоянието на целевите видове в моделни находища чрез наблюдения, провеждани съгласно “Методика за мониторинг на висши растения“ и “Методиката за оценка на състоянието на висши растения“ от НСМБР / Национална система за мониторинг на биологичното разнообразие/ (<http://eea.government.bg/bg/nsmos>).
 - Установяване на екологичните характеристики на естествените местообитания на видовете – надморска височина, изложение, наклон, влажност, тип на почвения субстрат, за да се има предвид при отглеждането им *ex situ*.
 - Провеждане на фенологични наблюдения на видовете по методичните указания на Бейдеман (1974), с цел установяване на темповете на растеж и развитие.
 - Събиране на материал /пъпки, цветове, корени и надземна маса/ от целевите видове в количества съобразени с Разрешително от МОСВ по реда на Закона за биологичното разнообразие (2002) за целите на изследванията провеждани от останалите РП.
 - Събиране на размножителен растителен материал от целевите видове за *ex situ* колекции и *in vitro* размножаване, в зависимост от биологичните им особености и в количества, съгласувани с МОСВ, и регламентирани въз основа на Разрешително по реда на Закона за биологичното разнообразие (2002).
 - Опити за култивиране на видовете според методичните указания на Евстатиева (2005) в експерименталните бази на ИБЕИ /София и Витоша / и АУ, Пловдив.

4.1.2. Задачи според работната програма на проекта

1. Локализиране и описание на популациите на целевите видове и събиране на материал за създаване на *ex situ* колекции на целевите видове и за научните изследвания по останалите задачи на проекта

2. Мониторинг на естествените популации на целевите видове

3. Опити за култивиране на целевите видове на опитните площи на ИБЕИ, БАН

4.1.3. Резултати

4.1.3.1. Хорологична справка

Направена е хорологична справка за изследваните видове на базата на хербарните образци в хербариумите – (SOM) ИБЕИ, БАН; (SO) СУ “Кл.Охридски”; (SOA) Аграрен Университет – Пловдив и литературни източници, като резултатите са представени в съответните хорологични таблици за всеки изследван вид.

4.1.3.2. *In situ* и *ex situ* изследвания

С цел получаване на съвременни данни за разпространението на целевите видове и оценка състоянието на популациите им в периода 2019-2022 г. бяха проведени редица теренни изследвания, в резултат на които е установено разпространението на видовете в страната чрез използването на *маршрутен* и *стационарен метод*. Оценени са основни екологични и фитоценотични параметри на популациите на изследваните видове, като площ, надморска височина, изложение, тип почва, овлажняване, тип на растителните съобщества с тяхното участие, численост и/или проективно покритие, с отчитане на флористичен район, отчетна единица, фенологична фаза, GPS координати на местообитанието, характеристика на местообитанието, площ и плътност на популацията, проективно покритие, наличие на инвазивни видове, заплахи на базата на „Методика за мониторинг на висши растения“ (Gussev et al 2008). Данните се нанесени на унифицирани и утвърдени от МОСВ формуляри. От представителни популации на изследваните видове бяха пренесени живи растения и събрани семена за създаването на *ex situ* колекции и отглеждането на четирите лечебни вида в култура, върху почвени субстрати и хидропонни системи. Създадени са *ex situ* колекции от целевите видове опитните бази на ИБЕИ-опитно поле и оранжерия и АУ-опитно поле.

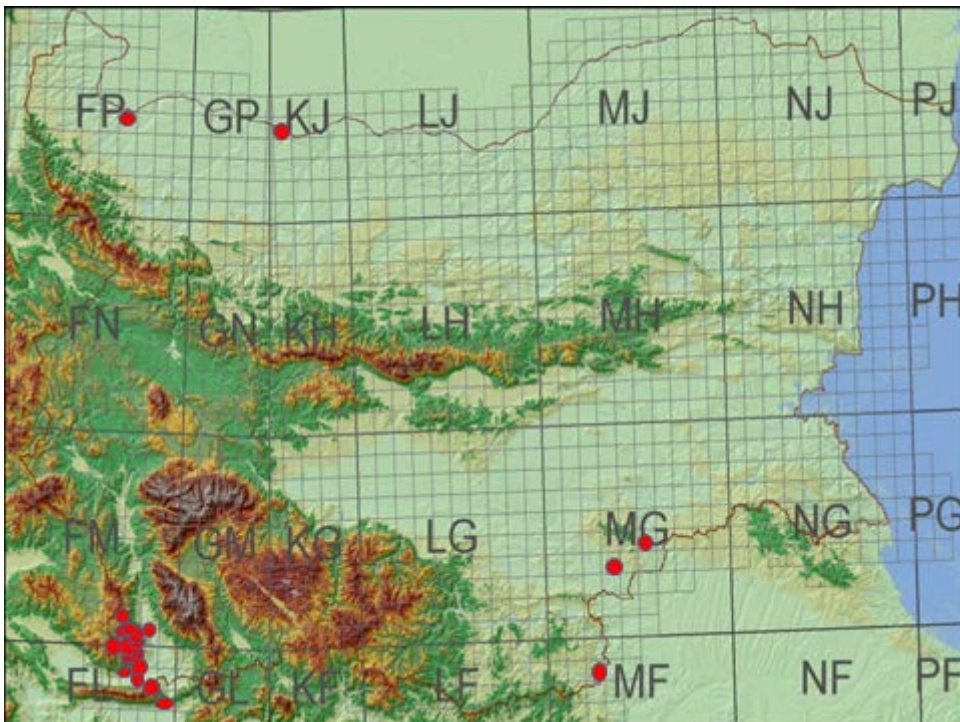
Alkanna tinctoria (L.) Tausch

1. Локализиране и описание на популациите на вида

При направената хорологичната справка за *Alkanna tinctoria* са установени 76 хербарни обзаци събрани в периода 1930-2010 г. от естествени популации в страната, както и данни за разпространението на вида публикувани в 6 литературни източника в периода 1918-1995 г. Най-много са хербарийните образци /50.77%/ събрани от флористичен район Струмска долина. От Източни Родопи те са 16.92%, от Дунавска равнина – 9.23%, Тракийска низина 6.15% и от района на Южен Пирин – 3.08%.

В резултат на проведените теренни проучвания е установено настоящото разпространение на *Alkanna tinctoria* в България, а именно: долината на река Струма и

Южен Пирин /описани са 17 популации/, Югоизточна България (Източни Родопи) /описани са 3 популации/ и Дунавска равнина /описани са 2 популации/. Находищата в Тракийска низина, Тунджанска хълмиста равнина, Странджа. и част от тези в Дунавска равнина и Югоизточна България, описани в литературни източници и хербарийните образци не са потвърдени. Вероятно причината за тяхното изчезване е промяната на условията на местообитание в резултат на изоставянето им или опожаряването им (наблюдавано при популацията в село Арчар, Дунавска равнина). Установени са местоположението, пространствената структура, размерът и възрастовата структура на популациите. Разработена е карта на текущото разпространение на вида на територията на страната /Фиг.1/.



Фигура1 Разпространение на *A.tinctoria* в България

2. Мониторинг

Наблюдаваните популации на *A. tinctoria* са фрагментирани, заемат открити добре осветени терени с глинесто-песъклива почва, като вида участва в състава на тревни и храстово-тревни ценози. Местообитанията на описаните популации са сухи, далеч от източници на вода, така че овлажняването може да се осъществява само чрез валежи. Намират се при ндморска височина от 50 до 380 м., в тревисти /Фиг. 2/ и храстови съобщества /Фиг. 3/. Наблюдават се различия между местообитанията на популациите в различните флористични райони: Изследваните популации в долината на река Струма растат върху силикатни или варовикови каменисти склонове, в тревисти съобщества, като голям брой от тях са съставени от единични растения или не голям брой малочислени групи от индивиди. Те са в неравновесено състояние /около 90% от индивидите в тези популации са в генеративна фаза/. Повлияни са от средиземноморски климат Популациите в Източните Родопи растат върху лептосолни

почви или варовити скали и също са повлияни от средиземноморски климат, преобладават цъфтящите индивиди. Популациите в Дунавската равнина растат върху вътрешни пясъчни дюни и са повлияни от умерено-континентален климат. И при тези популации преобладаваща е генеративната фаза.



Фигура 2 Тревисти съобщества



Фигура 3 Храстови съобщества

Заплахи:

В повечето случаи находищата на алканата са разположени в близост до населени места, обработваеми земи и пасища, причина за значителен антропогенен натиск върху тях, изразяващ се в утъпкване, паша на селскостопански животни и ерозия на терените. Този антропогенен натиск е по-осезаем при популациите от Струмската долина.

Проведеният мониторинг през годините на изпълнение на проекта /2019-2022/ показва, че популациите на вида запазват своя размер и са в добро състояние.

Извод:

В резултат на проведените теренни изследвания беше установено, че популациите на *A. tinctoria* в България са локализирани в четири флористични района на страната: Струмска долина, Южен Пирин и Източни Родопи и Дунавска равнина, като болшинството се намират в Струмска долина, която е основният район на разпространение на вида /останалите са представени с по една популация/.

Ниският брой ювенилни растения при всички изследвани популации на *A. tinctoria* показва, че те не са в равновесено състояние и при унищожаване на части от тях, те трудно ще се възстановят.

3.Ex situ изследвания

Създадена е *ex situ* колекция на опитното поле и в оранжерията на ИБЕИ и опитното поле на АУ Пловдив от индивиди на *A tinctoria* пренесени от естествените местообитания и такива отгледани хидропонно



Фигура 4 В оранжерията



Фигура 5 На опитното поле

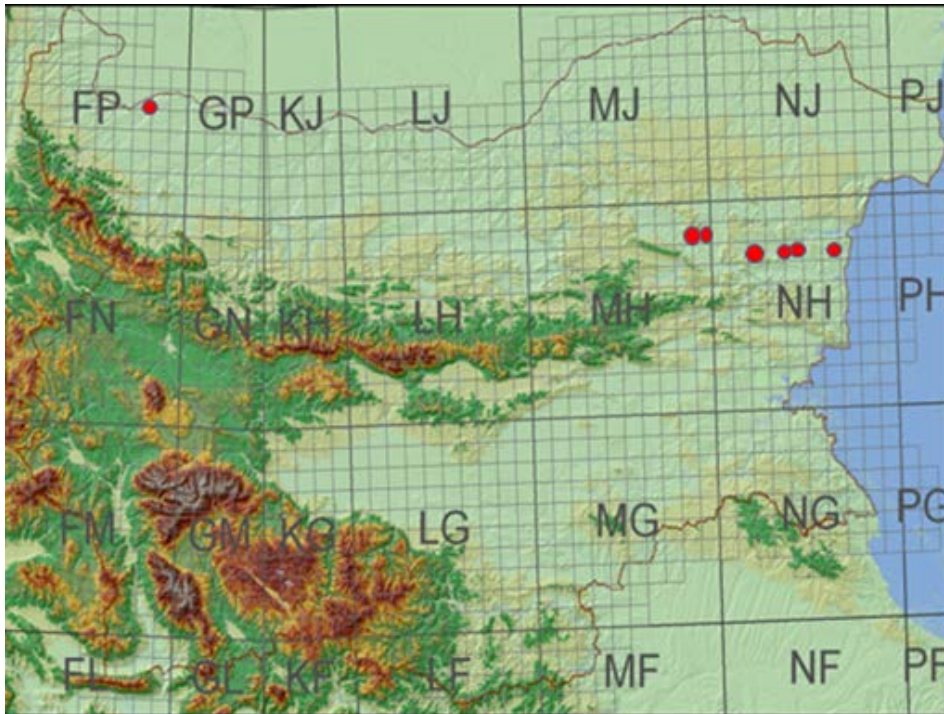
Helichrysum arenarium

1. Локализиране и описание на популациите на вида

Направена е хронологична справка за разпространението на вида в България, която показва съществуването на 27 хербарни образци от *H. arenarium* в хербариумите в страната, събрани в периода 1895-2003 и 9 литературни източници за периода 1901-2012 г. Най-голям е дялът на хербарните образци от района на Черноморското крайбрежие (северно, южно) – 51.85%, като най-често депозираните хербарийни листове са от локалитети на вида около Варна, Побитите камъни, Белослав. Друг значителен дял /37.03% /от хербарните листове на вида се пада на локалитетите в Североизточна България (Провадия, Шумен, Каспичан)

Съгласно литературните данни, жълтият смил е разпространен в 7 флористични райони на страната – Североизточна България, Черноморско крайбрежие, Предбалкан, Знеполски район, Западни гранични планини, Дунавска равнина и Тракийската низина. Прегледът на хербарните материали обаче показва, че съществуват такива единствено от Североизточна България и Черноморско крайбрежие.

В резултат на проведените теренни проучвания е установена актуалното разпространение и локализация на популациите на *H. arenarium* на територията на България /Фиг.6/. Потвърдено е разпространението на вида следните флористични райони на страната: Североизточна България, Черноморско крайбрежие Дунавска равнина. Верифицирани са по 3 находища в Североизточна България и Черноморско крайбрежие и едно малочислено в Дунавска равнина.



Фигура 6. Разпространение на *H. arenarium* в България

2. Мониторинг

Helychrisum arenarium участва в хабитат от европейска значимост EUNIS E1.9B Sanding stone inland dunes. Местообитанието представлява разкрития на пясъци с терциерен произход в западната част на Варненската тектонска падина от двете страни на Белославското езеро /Фиг.7/ Те са част от тревисти съобщества на варовити пясъчни сухи терени разположени в равнини и плата.



Фигура 7



Фигура 8

Растителността е комплекс от псамофити, хазмофити, горски и храстови ценози. Установено бе, че находищата на вида заемат заравнени участъци покрити с пясъци върху варовикова скална основа, при надморска височина от 90 до 380 м. и са с площ от 00.5 до 5 ha. Числеността на жълтия смил в тях варира между 0.1 и 0.5 бр./ m². В

момента на изследването наблюдаваните популации на *H. arenarium* са в добро състояние, с изключение на тази на Илчов баир – Шумен /Фиг. 8 / която се състои от не повече от 100 индивида, които са по-дребни от тези в останалите проучени популации.

Местообитанията на описаните популации са сухи, далеч от източници на вода, а овлажняването може да се осъществи само атмосферно /валежи, оросяване/.

Проведеният мониторинг през годините на изпълнение на проекта /2019-2022/ показва, че популациите на вида запазват своя размер и са в добро състояние.

Заплахи:

Идентифицираните заплахи включват ерозия на почвата, развитие на конкурентни и инвазивни видове. Находищата са негативно повлияни от антропогенни дейности, като вадене на инертни материали, утъпкване и навлизане на инвазивни растителни видове, които подтискат развитието на жълтия смил. Голяма част от популациите съобщени в литературата не бяха намерени, поради провеждането на селскостопански и строителни мероприятия в посочените райони, които са довели до тяхното унищожаване.

Извод:

В рамките на текущото изследване, е установено разпространението на *H. arenarium* в България, основно в шест популации, в североизточната част на страната, в тясна ивица между градовете Шумен и Варна. Това налага необходимостта от преразглеждане на статута на вида в българската флора и включването му в Закона за биологичното разнообразие като рядък вид.

3. *Ex situ* изследвания

Създадена е *ex situ* колекция на опитното поле и в оранжерията на ИБЕИ и опитното поле на АУ Пловдив от индивиди на *H. arenarium* пренесени от естествените местообитания и такива размножени *in vitro* /Фиг. 9, 10/



Фигура 9 В оранжерията



Фигура 10 На опитното поле

Primula veris

1. Локализиране и описание на популациите на вида

В резултат на направената хорологична справка установихме 76 хербарни образци на събрани в периода 1888-1993 и 5 литературни източника за периода 1909-1991 г /Приложения 1 и 2/. Разпределението на образците по флористични райони е: Стара планина (източна, средна, западна) – 25%; Родопи (източни, средни, западни) – 38.16%; Западни гранични покрайнини (Осогово) – 6.58%; Софийски район (Витоша), Знеполски район по 6.58%; Средна гора – 5.26% и Пирин – 9.21%. Установени бяха данни за разпространението на вида в 14 от 20-те флористични райони в страната /Родопи, Стара планина, Средна гора, Пирин, Западни гранични планини, Софийски район, Рила, Славянка, предбалкан, Тракийска низина, Тунджанска хълмиста равнина, Знеполски район, беласица, Витоша/. Хорологичните данни показват, че *Primula veris* в страната е представена с два подвида – *Primula veris* ssp. *canescens*(Opiz)Hayek ex Lüdi in Nagi, разпространен от 0 до 1000 м н.в. и *Primula veris* ssp. *columnne*(Ten) Lüdi in Nagi разпространен над 1000 м н.в.

2. Мониторинг

През периода на изпълнение на проекта бяха проучени популации на вида в 3 флористични района – Пирин-над село Илинденци, Знеполски район-Голо бърдо над Перник и Централни Родопи-над хижа Марциганица. Находищата са намерени при 910 м.н.в /Знеполски район/, 1100 м.н.в .Пирин/ и 1317 м.н.в / Родопи/ и заемат заравнени терени с наклон от 0-5°/Фиг.22/. На Пирин находището е върху основна скала силикат и

е с площ 0.2 ha и ниско проективно покритие на вида 0.2%. В Знеполски район находището е върху основна скала варовик с площ от 0.1ha и проективното покритие на вида 0.4%, в Родопите находището е върху варовикова основа, с площ от около 0.5 ha и проективно покритие на вида от около 0,7%.

Проведеният мониторинг през годините на изпълнение на проекта /2019-2022/ показва, че популациите в Пирин и Стара планина са запазили своите размери и като цяло са в добро състояние, докато тази на Голо Бърдо /най-малочислената от трите/ е редуцирала своя състав. Причина за това вероятно е най-голямата близост на тази популация с населени места и малката ѝ численост.

Заплахи:

Проведените наблюдения върху изследваните популации на *P. veris* показват, че по-сериозните заплахи за тяхното състояние са антропогенното въздействие и естествената ниска кълняемост на семената съобщена в повечето изследвания на вида.

Извод:

В рамките на текущото изследване е установено, че българските популации на *P. veris* са фрагментирани и силно се влияят от антропогенно въздействие, добавено към естествено ниската кълняемост на семената.

3. Ex situ изследвания

За целите на *ex situ* изследването през 2019 г. пренесохме живи растения от естествените популации на вида, които засадихме в оранжерията на ИБЕИ и на опитните площи на ИБЕИ и АУ Пловдив, с цел създаване на *ex situ* колекции на вида /Фиг. 11/. Колекцията на ИБЕИ в последствие беше допълнена и с растенията отгледани от предварително стимулирани семена.



Фигура 11. Растения от *P. veris* отглеждани в оранжерията и на опитното поле

Arctostaphylos uva ursi

1. Локализиране и описание на популациите на вида

При направената хорологична справка установихме 66 хербарни образци на мечо грозде, събрани в периода 1899-2007 и 6 литературни източника от периода 1901-1961. Справката, показва, че най-голям брой находища се съобщават за Витоша-24.24%; Стара планина-28.79%; останалите хербарни образци са: от Родопи – 18.18%; Пирин - 15.15%, Славянка (Али ботуш) – 12.12%.

2. Мониторинг

В рамките на проекта, бяха описани и мониторирани пет популации на вида: Витоша /местност „Камен дел“; Стара планина /Козята стена/; Средни Родопи /Чаирдере/; Пирин /Беталовото/ и Алиботуш /Славянка.

За изследваните популации на мечото грозде, подобно на популациите на повечето растителни видове, е характерно груповото разпределение. То се определя от локалните различия на средата, при което индивидите се струпват в по-благоприятните условия. Пространствената структура на популациите не е константна, а се променя, в зависимост от настъпващите изменения на околната среда. Настъпващите изменения имат приспособителен характер. Проективното покритие на мечото грозде в описаните популации е в много висок процент /почти до 100%/

Проведеният мониторинг показва, че и петте популации са в стабилно състояние по отношение на техния размер и статус на отделните индивиди.

Заплахи:

Проведените наблюдения показаха, че в популациите на мечото грозде преобладават средните по възраст групи и почти липсват ювенилни индивиди. Това е причина те да бъдат определени като такива от „стареещ тип“. Антропогенното въздействие е една от основните заплахи за нормалния растеж и развитие на вида. Засиленият интерес към неговите лечебни качества е причина за прекомерното му събиране като билка (*Folium Uvae Ursi*), което е съпроводено с утъпкване на находищата, а често и с изскубване на цели растения.

Извод:

За популациите на мечото грозде е характерно груповото разпределение. *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel обикновено се развива като пионерен вид на скалисти и каменисти терени с оптимум на развитие в субалпийския пояс. В условия на силно нарушена почвена и растителна покривка, може да участва и в изграждането на вторични съобщества. Развива се добре върху скални разкрития и камъни, където дава началото на формиране на фитоценози. Този процес е бавен и в началните етапи в тези съобщества няма други видове или ако има – те са много малко. Затова проективното покритие на мечото грозде често достига до 100%.

Антропогенното въздействие е една от основните заплахи за нормалния растеж и развитие на мечото грозде. Необходимо е предприемането на още мерки за опазване на вида и възстановяване на популациите му, освен включването на съобществата му в Червена книга на България, Приложение № 1 на Закона за биологичното разнообразие и в границите на национални и природни паркове, както и в защитени зони от Европейската екологична мрежа Натура 2000. Важна стъпка са мониторинговите наблюдения и своевременна реакция при възникваща опасност за състоянието на местообитанията му. Необходим е строг контрол и ефективно прилагане на нормите и режимите в защитените територии.

3. *Ex situ* изследвания

Иницирирана е *ex situ* колекция от вегетативно размножени вкоренени издънки от майчиното растение в оранжерията на ИБЕИ /Фиг.12/



Фигура 12. *Ex situ* отглеждани на вкоренени издънки от мечо грозде

Проблемното кълнене на семената и бавното нарастване на растенията при естествени условия, предопредели и бавното нарастване на вкоренените издънки при *ex situ* условия / в оранжерията/. Затова, за по-дефинитивни резултати е необходимо повече време, което излиза извън рамките на проекта.

Иницирирана е *ex situ* колекция и от хидропонно вкоренени резници на Червена боровинка (*Vaccinium vitis-idaea* L.), използвана като референтен вид в настоящото изследване, от същото семейство, също включен в Списъка на видовете лечебни растения под специален режим на опазване и ползване в България, базиран на Закона за лечебните растения (2000), участващ заедно с Мечото грозде в застрашеното

местообитание тип 09F2 Високопланински съобщества. Подобно на Мечото грозде показва бавен растеж и развитие, но значително по-успешно от Мечото грозде /Фиг.13/.



Фигура 13. Хидропонно вкоренени резници от червена боровинка отглеждани в оранжерията

Извод:

Настоящото изследване потвърди трудността за култивирането на мечото грозде и необходимостта от по-дефинитивни и продължителни изследвания с цел установяване на оптималните условия за култивиране на това високопланинско растение обитаващо високопланински терени със специфични екологични условия.

4.2. Работен пакет 2. Фитохимична характеристика и метаболомика

РП 2 е представен от Проф. Страхил Берков, доцент Милена Николова и химик Марина Димитрова, които са специализирани в химията на алкалоидите, аналитичните методи (GC-MS, HPLC-UV/MS, NMR) и тяхното приложение при анализи на БАВ, както и в метаболомиката, изучаването на активността на БАВ /повърхностни флавоноиди, антирадикалова активност/ и определяне съдържанието, състава и динамиката на натрупването им в защитени и ценни лечебни растения.

4.2.1 Изследователски методи и техники

•Метаболомният анализ (липиди, стероли, аминокиселини, органични киселини, моно-, ди- и тризахариди) се осъществява с газхроматография-маспектрометрия (GC-MS). Метаболитите се идентифицират чрез сравнение на техните мас спектри и индекси на задържане с тези от мас спектрални библиотеки (NIST 2008, GOLM) и литературни данни. Маспектрите се деконвулират със софтуерен пакет AMDIS, а мултивариационният анализ на данните се осъществява със софтуерен пакет Uncrambler X (Berkov & al. 2011). Метаболити, които не могат да бъдат анализирани чрез GC-MS, като сапонини се анализират чрез високоефективна течна хроматография (HPLC).

•Антиоксидантната активност се оценява чрез три опитни системи: 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикал, фосфомолибденен метод и β -каротен/линоленова киселина (Prieto & al. 1999; Kulisic & al. 2004; Marinova & Batchvarov 2011).

4.2.2.Задачи според работната програма на проекта

1 Подготовка на растителния материал събран от естествените популации на проучваните видове чрез третирането му с метанол за получаване на тотален екстракт

2. Метаболитно профилиране на екстрактите с ГХ-МС, ТСХ

3.Определяне на антиоксидантния потенциал на изследваните проби

4.2.3. Резултати

Helichrysum arenarium

Проведен е сравнителен анализ на метаболитния профил на цветни кошнички от различни популации на *H. arenarium* на базата на получени чрез екстракционни методи ацетонови ексудати. Сравнителният анализ на повърхностните съединения изолирани от цветните кошнички показва, че идентифицираните метаболити в ацетоновите ексудати на *H. arenarium* са представени от фенолни киселини, флавоноидни агликони, стероли и тритерпени, органични и мастни киселини, захари и захарни алкохоли. Установеният метаболитен профил на българските популации, след направено сравнение с описаните в литературата за вида, е определен като нов химичен тип (хемотип) на *H. arenarium*.

Направен е сравнителен анализ на състава на етеричното масло при българските популации на вида с този на *H. italicum*, наложил се на пазара. Резултатите показаха, че

пробите от *H. arenarium*, събрани и анализирани в настоящото изследване, имат специфичен профил на етеричното масло, който се различава от състава на етеричното масло на *H. italicum*. Установено е, че монотерпените (α -пинен, сабинен) са преобладаващият клас съединения в етеричното масло на *H. arenarium*, докато в етеричното масло на *H. italicum* доминират сесквитерпените (нерил ацетат и β -химахален).

Повърхностният ексудат, получен от цветовете на *H. arenarium*, е оценен чрез GC/MS за неговата инхибираща активност върху покълването и първоначалното удължаване на корена на *Lolium perrene* – един от най-разпространените плевели по културните растения. По същество, това е първото съобщение за химичния състав на ексудат от цветовете на *H. arenarium*, резултатите от което са обещаващи. Беше установено е, че ексудатният разтвор с концентрация от 5 mg/mL има силен инхибиращ ефект, както върху покълването на семената, така и върху първоначалното удължаване на корена на получените семеначета на *L. perrene*. Като основни биоактивни съединения на ексудата са установени флавоноидният агликон - нарингенин, монотерпеноидният фенол - карвакрол, хлорогеновата и 4-хидроксигеновата киселина.

Направен е сравнителен анализ на антирадикаловия капацитет на листа от *in vitro* отгледани и диворастящи растения от *H.arenarium*, както и на цветовете от диворастящи и *ex vitro* адаптирани растения. По-висока антирадикалова активност е установена в растителните органи от диворастящите индивиди.

Alkanna tinctoria

Проведен е сравнителен анализ на метаболитния профил на надземни и подземни части на *Alkanna tinctoria* чрез GC/MS.

Надземните части от 11 популации на *A. tinctoria* са анализирани сравнително за съдържание на метаболити чрез GC/MS. Фенолни, органични и мастни киселини, стероли, захари и захарни алкохоли са идентифицирани в метанолови екстракти от изследваните проби. Като основни фенолни киселини са идентифицирани кафеената и 4-хидроксигенова киселини.

Спектрофотометрично е определено общото съдържание на алканин в хексановите екстракти от корените, събрани от популации на вида от три различни фитогеографски района: Струмска долина, Дунавска равнина и Източни Родопи. Идентифицираното количество алканин при отделните популации е сравнено с това при търговски продукт-корени от *A. tinctoria*, при което е установено, че съдържанието на алканин в някои от опулациите от Струмска долина е близко и даже надвишава по количество, установеното в търговския продукт, който е с чужд произход. Тези резултати очертават визираните популации от Струмска долина като перспективни като изходни популации за култивирането им в качеството на източник на алканин.

Проведено е сравнително изследване на химичния профил на надземните части и корените, както и на общото съдържание на алканин в корените на 11 популации на вида от различни флористични региони на България. Надземните части на *A.tinctoria* са слабо проучени не само при български популации, но при вида като цяло. Анализирани са метанолови екстракти чрез прилагане на GC/MS. Идентифицирани са фенолни, мастни и органични киселини, стероли, полиоли, мастни алкохоли и захари. **За първи**

път се съобщава за наличието на ононитол в надземните части на вида, както и на фенолна киселина, както в надземните части, така и в корените. Резултатите показват, че надземните части на растението също са перспективни за използване като източник на ценни биологично активни вещества.

Primula veris

Анализирано е съдържанието на повърхностни флавоноиди при българските популации на *P. veris* чрез изследване на метаболитния профил на ацетонови ексудати от листа от изследваните популации на вида чрез GC/MS. Флавоноидните агликонни са идентифицирани като главни биоактивни съединения. Като тяхното количество достига до 50 % от общо идентифицираните флавоноиди.

Ексудатни съединения, идентифицирани в листата на *P. veris*, са тествани като инхибитори на покълването на семената и като уловители на свободните радикали. Съставът на ексудата се анализира чрез GC/MS. Тестът за покълване на семената се извършва в петриевы панички. Активността за улавяне на свободни радикали се определя чрез DPPH анализ. Това е първото съобщение относно инхибиторна активност върху покълването на семената на плевели по културните растения на ексудат от листа на *P. veris*, както и за техния антирадикален потенциал. Установено е пълно инхибиране на растежа на корена и 89% инхибиране на покълването на семена от *Lolium perenne* от воден разтвор на ексудат при концентрация 5 mg/mL. Установената антирадикална активност не е висока (IC₅₀ >200 µg/mL).

Arctostaphylos uva-ursi

Идентифицирани са биоактивните съединения на метаноловите екстракти на листни проби от три от целевите популации на вида / Пирин, Витоша и Средни Родопи/ чрез GC/MS и TLC. Общото съдържание на феноли е определено с помощта на реагент Folin-Ciocalteu. В най-високи количества са открити арбутин и хининова киселина. Галова киселина, катехин, 4-хидроксибензоена, хлорогенна киселина, тритерпени (α - и β -амирин, лупеол) витамини и други първични и вторични метаболити също бяха открити чрез GC/MS в изследваните проби. Флавоноиди (хиперозид, рутин, изокверцетин, кверцетрин) се откриват чрез TLC. Установени са разлики в съдържанието на отделните съединения между проби с различен произход. Въпреки това, не са установени значителни разлики в общото фенолно съдържание между проби от различен произход. Определено е и общото съдържание на феноли, както и процентното съдържание на арбутин. Количественият анализ показва, че няма съществени разлики между пробите с различен произход.

Заключение:

- Определен е метаболитният профил на проби от *Arctostaphylos uva-ursi* от три произхода. Съществени разлики в профилите от трите произхода не бяха установени. Най-високо съдържание на арбутин е установено в пробата от Витоша, затова тя се определя като перспективен изходен произход за култивирането на вида. Количественото съдържание на арбутина се влияе от условията на местообитание.

- Метаболитният профил на ексудат от листата на индивиди от естествената популация на *Primula veris* е анализиран и сравнен с този на индивиди култивирани в оранжерията след стимулиране на семенното покълване. Не бяха установени различия. Флавоноидни агликони са идентифицирани като основни компоненти на ексудата.

- Определена е антиоксидантната активност на екстракти от различни органи от целевите видове *Arctostaphylos uva-ursi* (листа), *Primula veris* (корени и листа), *Alkanna tinctoria* (корени и надземна част), *Helichrysum arenarium* (цветове). С най-висока радикал свързваща активност са листата от мечото грозде.

- Сравнително е анализиран метаболитният профил и антиоксидантният понециал на диворастващи и *in vitro* размножени и адартирани индивиди от *Helichrysum arenarium*. По-ниска антирадикалова активност показаха екстрактите от *in vitro* размножените индивиди. Не бяха установени разлики в метаболитните профили на диворастващи и *in vitro* отгледани индивиди.

- Установен е нов химичен тип (хемотип) на *H. arenarium* в България.

- Изследваните проби от надземните и подземни части на *A. tinctoria* показаха, че имат сходен качествен метаболитен състав като отделните компоненти варират в своето количествено представяне между отделните произходи. Мио-инозитолът, захарозата и фруктозните изомери са основни компоненти, представени в най-голямо количество в метаноловите екстракти. Фенолните киселини са по-добре представени в надземните части. В подземните стероли са повече, като диворастващите популации са с по-високо съдържание на стероли от комерсиалния продукт.

- Установена е инхибираща активност върху плевели по културните растения на ексудати от листа на *Primula veris* и цветни кошнички на *Helichrysum arenarium* върху семена на плевели по културните растения.

- Установено е наличието на ононитол в надземните части на *A. tinctoria*, които също се определят като перспективни за използване като източник на ценни биологично активни вещества.

4.3. Работен пакет 3. Ембриологични изследвания

РП 3 е представен от доц. д-р Елина Янкова-Цветкова, доц. д-р Петка Юркова-Грънчарова, младия учен /биолог Розалия Николова и биолог Татяна Стефанова – представители на единственото научно звено в България, в което се провеждат изследвания в областта на еволюционната, екологична и експериментална ембриология на диворастящи видове от българска флора, с приоритетна насоченост на изследванията върху репродуктивния потенциал на редки, застрашени и лечебни видове растения.

4.3.1. Изследователски методи и техники

- Сравнително-ембриологични проучвания на базата на изготвените по класическата парафинова методика трайни микроскопски препарати, за установяване особеностите на структурите и процесите в мъжката и женска генеративна сфера;
- Определяне жизнеността на полена, чрез третиране по Ацетокарминовия метод (Singh 2003) и директно отчитане на количеството на фертилния полен с помощта на светлинен микроскоп (Heslop-Harrison 1992);
- Определяне жизнеността на семената (зародишите) с Тетразолов тест (Peters 2000).
- Тестване на лабораторната кълняемост на семената.

4.3.2. Задачи според работната програма на проекта

- 1. Ембриологично проучване. Установяване на особеностите на мъжката и женска генеративна сфера и разкриване биологията на размножаване*
- 2. Оценка на репродуктивния потенциал чрез установяване степента на жизненост на полена и семената /в %/*

4.3.3. Резултати

Ембриологично са изследвани десет популации на *Alkanna tinctoria* – (осем от района Струмска долина, една от Източни Родопи и една от Дунавска равнина); шест популации на *Helichrysum arenarium* (две от Черноморско крайбрежие и четири от Североизточна България); три популации на *Primula veris* (Пирин, в борова гора над с. Илинденци; Знеполски район, Голо Бърдо над Перник; Родопи, над Бачково) и три популации на *Arctostaphylos uva-ursi* (Витоша, местността „Камен дел“, Пирин, Беталовото и Стара планина, местността „Козята стена“)

Ембриологично изследване

За целите на ембриологичното проучване събраният материал от цветни пъпки и цветове в различен стадий на развитие от популациите на целевите видове е фиксиран във ФОА и след това е включен в парафин. Последващата обработка е извършена по общоприетата класическа парафинова методика. С помощта на ротационен микротом са направени парафинови срези с дебелина от 8 до 15 μm (в зависимост от възрастта и други специфики на материала). Оцветяването е извършено с железен хематоксилин по Heidenhain (1886). Изготвени са трайни микроскопски препарати, чрез включване на

срезите в Ентелан. Наблюденията са проведени със светлинен микроскоп “Olympus” CX21. Микрофотографиите са направени с дигитална камера “Infinity lite”, 1,4 Мрх.

Оценка на жизнеността на полена на изследваните видове

Жизнеността на полена е изучена във връзка с установяване начина на размножаване и възможностите за реализация на репродуктивния капацитет на популациите на изследваните видове. За целта са преброени зрелите поленови зърна в 30 прашника за всяка от изследваните популации на отделните видове.

Жизнеността на зрелия полен е изследвана чрез оцветяване с ацетокармин - ацетокарминов тест (Singh 2003) и оценена в зависимост от интензитета на оцветяване от багрилото. Цитоплазмата и ядрата на жизнените поленови зърна се багряват в червено, а нежизнените и стерилните – не се оцветяват.

Оценка на жизнеността на семената (зародишите)

За оценка на жизнеността на зародишите е приложен тетразолов тест (Peters 2000). За целта семената са инкубирани в 1% разтвор на 2, 3, 5-tripheniltetrazolium chloride за 24 часа, съгласно методика, разработена от AOSA (Association of Official Seed Analysts). Първоначално разтворът на тетразоловия хлорид е безцветен, но впоследствие променя цвета си от тъмнорозово до червено, в резултат от действието на водородни йони, отделени при жизнената дейност на зародишите (в процеса на дишане). Зародишите, които са физиологично активни се оцветяват в червено и се отчитат като жизнени, а частично оцветените и неочветените – като нежизнени. Преди да бъдат третирани с 1 % разтвор на тетразолов хлорид, семената са инкубирани за 24 часа във вода, при температура 25 °C.

Тестване на лабораторната кълняемост на семената

Тестването на кълняемостта на семената (съхранявани при стайна температура) е проведено в петрита, върху навлажнена филтърна хартия в лабораторни условия.

Резултати от приложените методи на изследване

Ембриологично изследване

На базата на проведените ембриологични изследвания е изведена ембриологичната характеристика на четирите изследвани вида: описани са особеностите на структурите изграждащи мъжкия /тичинките/ и женския /плодника/ гаметофит, както и начина на протичане на процесите в тях. Резултатите показваха, че всичките са полово размножаващи се, чрез семена, с правилно протичане на процесите водещи до образуване на полен и семена. Вегетативното размножаване също е застъпено в различна степен при отделните видове, най-силно – при мечото грозде.

Оценка на жизнеността на полена

Оценката за жизнеността на зрелия полен чрез прилагане на ацетокарминовия тест за жизненост на полена, показва, че и при четирите вида болшинството поленови зърна са жизнени. Установеният процент на жизненост е съответно: между 95,27% и

98,67% при популациите на *A. tinctoria*; между 71,39% и 93,83% при популациите на *H. arenarium*; между 95,84% и 98,05% при популациите на *P. veris* и между 95,62% и 96,7% при популациите на *Arctostaphilus uva ursi*.

Оценка на жизнеността на семената

При направената оценка на жизнеността на семената чрез прилагане на тетразоловия тест за жизненост, бяха получени следните резултати:

- При *A. tinctoria* и *H. arenarium* жизнеността на семената варира в сравнително широки граници – съответно между 90% и 64 % при популациите на *A. tinctoria* и между 4% и 61 % при популациите на *H. arenarium*

- При популациите на *A. uva ursi* и *P. veris* варирането е в значително по-тесни граници – съответно между 43,75% и 53,3% при *A. uva ursi* и между 2% и 4% при *P. veris*

- Сравнително тестване на семена на *P. veris* събрани от растения от естествени популации на вида и от растения от създадената *ex situ* колекция показва значително увеличаване на жизнеността на семената събрани от растения от *ex situ* колекцията /до над 60%/.

- Проведеното сравнително изследване на жизнеността на семената през различни години показва, че количеството жизнени семена се променя през различните години под влияние на климатичните условия /температура, валежи/, като това вариране е най-голямо при популациите на *A. tinctoria* (до 40 % при една от популациите).

Кълняемост на семената

Проведено е тестване на кълняемостта на семената в лабораторни условия, при стайна температура, в петрита, върху навлажнена филтърна хартия. Кълняемост при тези условия беше отчетена единствено при популациите на *H. arenarium*, като при някои от тях достигаше 80-96 %. Повечето покълнали семена обаче мухлясваха и загиваха и едва около 8-9 % от тях се развиваха до семеначета, които при пренасянето от филтърната хартия върху почвен субстрат или върху кокосови стърготини загиваха. При *A. tinctoria*, покълваше само по едно семе /от 30 заложени семена/ и то само при някои от популациите. Получените семеначета бяха много малки и изключително нежни и пренесени върху субстрат за доизрастване загиваха. Семената на *P. veris* и *A. uva ursi* изобщо не покълваха, първите поради дълбокия семенен покой, вторите заради твърдата семенна обвивка.

Заклучение:

– За първи път се провежда изследване на основни характеристики на репродуктивната биология (ембриологични особености, жизненост на полена, жизненост и кълняемост на семената) на български популации на целевите видове, като за *Arctostaphylos uva ursi* и *Helichrysum arenarium* то е като цяло първо и като такова се явява принос и обогатява ембриологичната характеристика на съответните род и семейство, към които принадлежат изследваните видове. Параметрите на репродуктивния потенциал /жизненост на полена, жизненост и кълняемост на семената / се проучват за първи път и при четирите изследвани вида.

– Процесите водещи до образуване на полена и семената при изследваните видове протичат правилно, без съществени отклонения, което е предпоставка за висок репродуктивен потенциал, което заедно с установената висока жизненост на полена, им осигурява възможност за успешно възобновяване на популациите. По-ниската жизненост на семената /в сравнение с тази на полена/ е резултат от въздействието на екологичните условия върху количеството и качеството на произведените семена.

- Установената жизненост на семената е свидетелство за една задоволителна степен на реализиране на репродуктивния потенциал, която зависи от екологичните условия и варира в широки граници.

- Ниската кълняемост на семената на *Primula veris* и *Alkanna tinctoria* и преживяване на семеначетата на *Helichrysum arenarium*, установени в лабораторни условия, се дължи на семенен покой и физиологични причини.

- Отглеждането на растения от *Primula veris* при контролирани условия /в *ex situ* колекции/ повишава значително жизнеността на образуваните семена /с около 60%/.

4.4. Генетични изследвания и течна цитометрия

РП 4 е представен от доц. Владимир Владимиров, специалист в областта на течната цитометрия, проф. Петър Желев, който е специалист в разработването и приложението на генетични маркери към растителни системи, доц Ина Анева, специалист в областта на опазване на лечебните растения и техните генетични ресурси.

4.4.1. Изследователски методи и техники

- Течна цитометрия за определяне типа на размножаване /сексуално или апомиктно/(Hojsgaard & Herbig 2013) и контрол на пloidното ниво на третираны с колхицин семена и вегетативни органи с помощта на течен цитометър PARTEC CyFlow SLGreen. ;

- Генетични анализи с приложение на ДНК-маркери. Ще бъде приложен метод на полимеразна верижна реакция (PCR) за амплифициране на фрагменти ДНК с два типа маркери: микросателити и ISSR.

4.4.2. Задачи според работната програма на проекта

1. Екстракция на ДНК и определяне на ДНК профилите на изследваните видове

2. Определяне размера на генома и пloidното ниво на зародиша и ендосперма чрез метода на течната цитометрия

4.4.3. Резултати

1. Екстракция на ДНК и определяне на ДНК профилите на изследваните видове

Екстракцията е осъществена с Invisorb Spin Plant Mini Kit при *P. veris* и *A.uva ursi*, с Invisorb Spin Plant Mini Kit и модифициран СТАВ протокол (Doyle & Doyle, 1990) при *A. tinctoria* и с модифициран цетилтриметил амониев бромидполивинилпиролидон (СТАВ-PVP) протокол при *H. arenarium* (Kramberger et al 2021). Количеството и качеството на екстрахираната ДНК е проверявана с помощта на спектрофотометър и чрез електрофореза в агарозен гел (Barbas et al., 2007).

Дендрограмите, построени на базата на генетичните дистанции между популациите, и при четирите изследвани вида показва, че съществува съответствие между географските и генетичните дистанции, които отговарят на дистанциите между отделните популации: при *P.veris* и *A.uva ursi* изследваните популации са ясно обособени, тъй като попадат в различни географски райони, при *A. tinctoria* популацията от Дунавска равнина се обособява по-ясно от останалите популации от Струмска долина, които са по-близки помежду си, докато популациите на *H. arenarium* не се разграничават ясно една от друга, тъй като географски са много близко разположени.

Направената оценка на базата на ISSR маркери установява, и при четирите изследвани вида, близки стойности на показателите на разнообразието, което е указание за ниско ниво на генетична междупопулационна вариабилност.

Проведеното генетично изследване на *in vitro* размножени растения от *H. arenarium* и на отгледани хидропонно растения от *A. tinctoria*. показва, че генетичният профил на такива растения не се различава от този на изходните растения.

2. Изследване плоидното ниво на зародиша и ендосперма чрез метода на течната цитометрия

Количеството ядрена ДНК и размерът на генома (C-value) при четирите изследвани вида са определени с помощта течен цитометър CyFlow SL Green на PARTEC, Германия. Обработката на материала /свежи листа или семена от целевите видове/ е извършена с произведения от SYSMEX & PARTEC комплект за растителни тъкани CyStain PI Absolute P, следвайки предоставения в комплекта протокол. C-стойностите са определени чрез сравняване със стандарт, с вече известна стойност на размера на генома. За да се гарантира еднаква обработка на целевото растение и стандарта, двата растителни обекта се смесват и се обработват заедно в една и съща епруветка (целеви обект + вътрешен стандарт). Като стандарти са използвани свежи листа от *Pisum sativum* сорт "Kleine Rheinländerin" ($1C = 1Cx = 4.38 \text{ pg}$) или от *Solanum pseudocapsicum* ($1C = 1.295 \text{ pg}$). Измерените C-стойности при популациите на отделните видове са много близки, което показва стабилност на плоидното ниво в границите на вида, което своя страна е указание за стабилност в типа на размножаване.

Проведеният анализ на типа на размножаване през различните вегетационни сезони показва сравними C-стойности през отделните вегетационни сезони и при четирите вида, т.е. запазване на типа на размножаване.

При проведеното цитометрично изследване на растения от изследваните популации на *H. arenarium*, получени чрез *in vitro* култивиране не бяха открити отклонения в нивото на плоидност в сравнение с това на естествените популации Това показва, че *in vitro* размножаването е подходящ метод за култивиране на *H. arenarium*, тъй като не се променя размерът на генома, запазва се плоидното ниво на изходните растения, респективно тяхното качество.

Заклучение:

-Установено е ниско ниво на генетична вариабилност между популациите на изследваните видове, което предполага ограничения за тяхното разпространение и в голяма степен допринася за фрагментираността на техните популации и ограничение в ареала на разпространение.

- Не е установено вариране в плоидното ниво между популациите на целевите видове

- *In vitro* размножените растения от *H.arenarium* и хидропонно отгледаните от *A. tinctoria* запазват генетичния профил и плоидното ниво на изходните растения.

- Установената ниска генетична вариабилност и сравними С-стойности през отделните вегетационни сезони и при четирите вида са указание за стабилност на типа на размножаване.

- Използваният метод за *in vitro* размножаване на *H. arenarium* чрез директна органогенеза е подходящ метод за култивиране не само на този вид, но и на други ценни диворастящи видове растения, тъй като при прилагането му не се променя размерът на генома, запазва се пloidното ниво на изходните растения, респективно тяхното качество.

4.5. Работен пакет 5 Растителни биотехнологии и хидропонни култури:

РП5 се състои от млади учени и докторанти ръководени от доц. Марина Станилова, която основа Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения, в рамките на ръководения от нея международен проект NATO SfP 974453-Bioproduction (2001-2006) и разви направлението по растителни биотехнологии в ИБЕИ. Доцент Станилова има опит в ръководството на дипломанти, докторанти и големи проекти, вкл. финансиран от ФНИ, свързани с *in vitro* размножаването на лечебни, редки и ендемични растения. Гл. ас.д-р Мария Петкова има опит при *in vitro* култивирането на ценни лечебни растения като *Arnica montana*. Докторантите Ася Кожухарова и Владимир Илинкин имат много добри резултати при клонално размножаване, а младият учен Борянка Трайкова – при *ex vitro* адаптиране, поддържане на *ex situ* колекции и хидропонно култивиране.

4.5.1. Изследователски методи и техники

- Инициране на *in vitro* култура от семена (George 1996).
- Клонално микроразмножаване (George 1996).
- Соматична ембриогенеза (George 1996).
- Ризогенеза и hairy root култури (Giri & Narasu 2000).
- Повишаване плоидността на растенията, чрез третиране с колхицин на семена и вегетативни органи *in vitro* (Mori et al.; 2016; Henny & al. 2009). Тетраплоидните растения са с по-големи размери, а при някои лечебни растения е отбелязано съществено повишаване на съдържанието на синтезираните от тях БАВ.
- *Ex vitro* адаптация и аклиматизация на *in vitro* вкоренените растения (George 1996).: чрез засаждане в саксии с почвен субстрат, като адаптацията им към нормални условия се осъществява поетапно: в климатична камера (POL-EKO Aparatura) със стриктен контрол на влажността, температурата и осветлението, симулиращи денонощните им флукутации, при плавно намаляване на влажността от 90 до 60% за 4 до 6 седмици, след което във фитотронно помещение с контролиране на условията в по-широк диапазон. Аклиматизацията се извършва в оранжерия, след което растенията се засаждат на опитни площи.
- Хидропонно /безпочвено/ култивиране (Sardare & Admane 2013).: от семена или от вегетативни органи, при използване на наличните хидропонна (Cutting Board) и аеропонна (Green Diamond, GH) системи, както и на нова хидропонна система (Aero Flo-14). Получените растения се аклиматизират в оранжерия и засаждат на опитни площи

4.5.2. Задачи според работната програма на проекта

- 1. Инициране на *in vitro* култури от семена или от вегетативни растителни органи;**
- 2. Стимулиране кълняемостта на семената *in vivo* и *in vitro***
- 3. Получаване на *in vitro* растения чрез директна и индиректна регенерация и определяне влиянието на растежните регулатори, техниките за суб-култивиране и параметрите на околната среда (температура, осветление)**
- 4. Адаптиране на *in vitro* получените растения към условията на околната среда**
- 5. Култивиране на целевите видове в хидропонни системи.**

4.5.3. Резултати

4.5.3.1. Инициране на *in vitro* култури от семена или от вегетативни растителни органи;

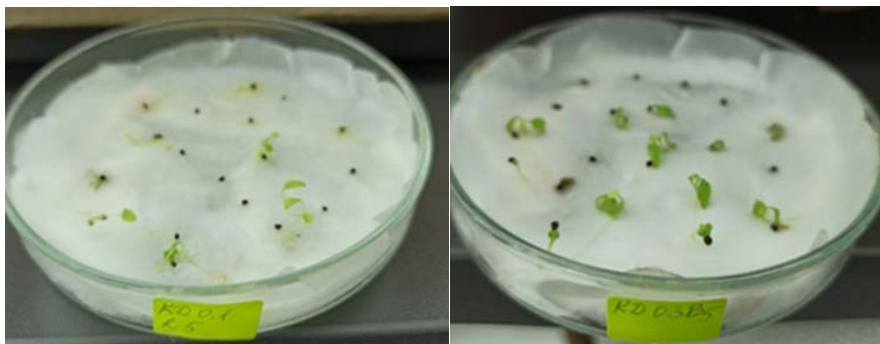
Бяха проведени опити за получаване на семеначета *in vitro* чрез покълване върху основна MS хранителна среда. Единствено при *Helichrysum arenarium* бе отчетена сравнително висока кълняемост на семената, като при този вид, въпреки значителната микробна контаминация, успешно бяха иницирани *in vitro* култури от 5 популации на вида. При семената от останалите видове кълняемостта беше проблемна: само едно семе покълна от няколко стотин *in vitro* заложили при *Primula veris*, а при *Alkanna tinctoria* и *Arctostaphylos uva-ursi* бе отбелязана липса на покълнали семена.

Приложени бяха различни методи за стимулиране на кълняемостта, като: предварително третиране с ниска температура, гиберелинова киселина за различен период от време, или залагане върху MS хранителна среда, съдържаща гиберелинова киселина, но нито един от тези методи не даде резултат. В допълнение, при *A. tinctoria* бе направен опит за инициране на *in vitro* култура от ембриони, но и той не даде резултат.

Трудностите по кълняемостта на семената от *A. tinctoria* и *Primula veris* бяха преодолени при условия *in vivo*, благодарение на широка схема от варианти, при която бе комбинирано предварително третиране на семената с гиберелинова киселина (GA3) и облъчване с монохроматична светлина 12 ч./ден (Фиг. 14, 15).



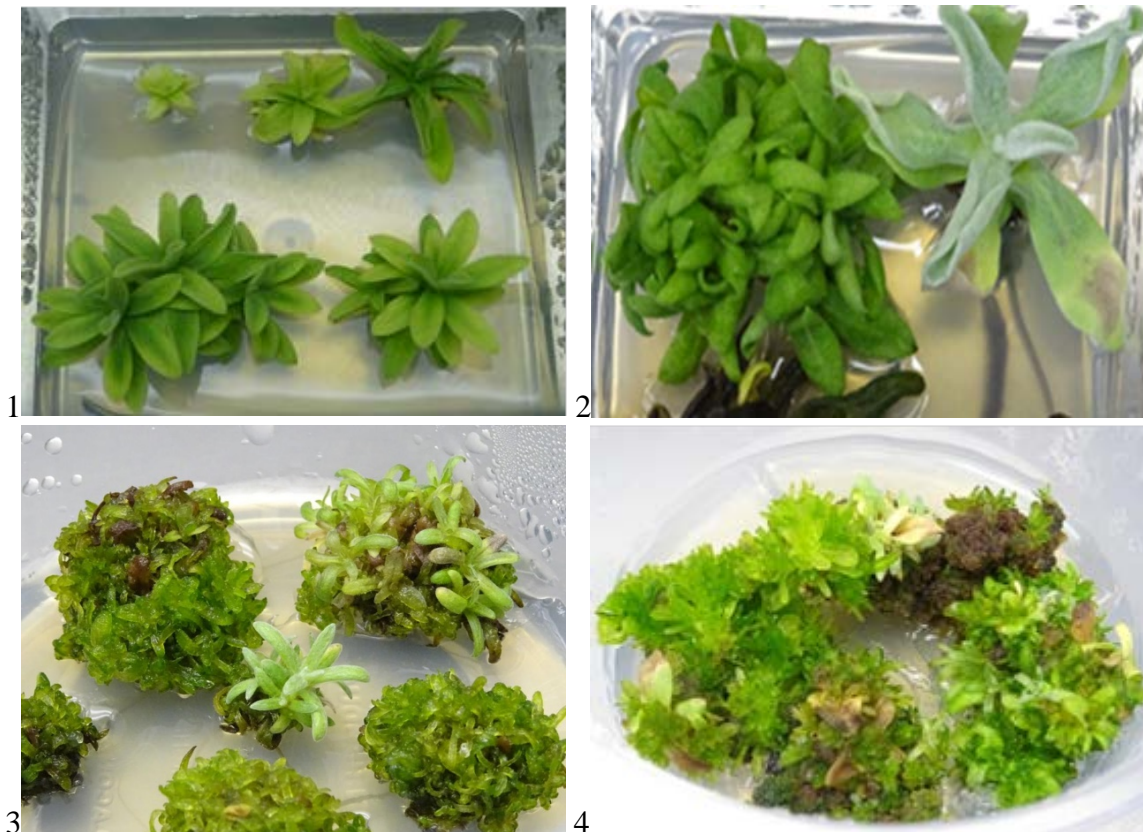
Фигура.14 Покълване на семена от *Alkanna tinctoria* при условия *in vivo* в петриеве панички, при прилагане на монохроматична светлина – отляво надясно: бяла, инфрачервена, червена, синя.



Фигура 15 Покълване на семена от *Primula veris* при условия *in vivo* в петриеве панички,

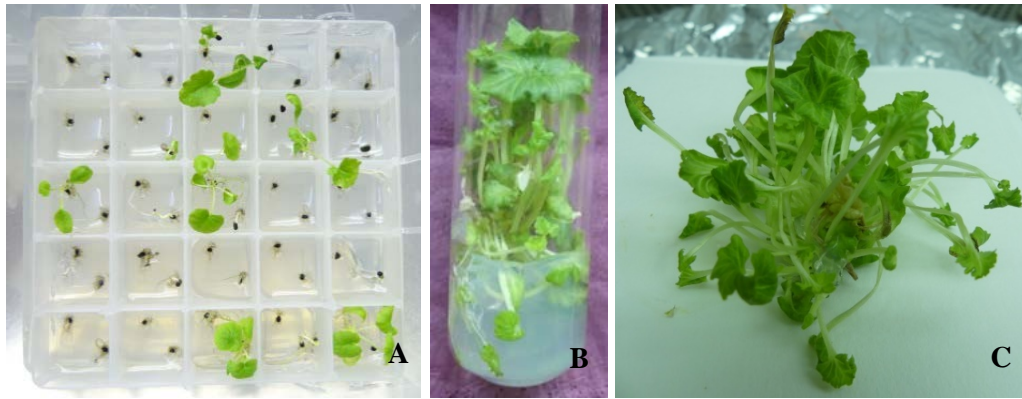
4.5.3.2. Получаване на *in vitro* растения

In vitro растения бяха получени само при *Helichrysum arenarium* чрез директна органогенеза върху основна хранителна среда MS без растежни регулатори и с 20 г/л захароза, от покълнали *in vitro* семена от естествените популации на вида (Фиг. 16.1 и 16.2). Когато към средата се добавяха ВАР и NAA, се наблюдаваше и образуване на калус, който при суб-култивиране се разрастваше бързо и се формираха растения, но в повечето случаи витрифицирани (Фиг. 16.3 и 16.4).



Фигура 16 1) и 2). Формиране на нормално нараснали растения чрез директна органогенеза на среда 3/4MS-20, 3) мултипликация, съпроводена от силна витрификация при повечето експланти 4) индиректна органогенеза при субкултивиране на калус

Семеначетата получени от *in vitro* покълналите семена от *Primula veris*, събрани от растения растящи в *ex situ* колекцията, образуваха само зачатъци на корени и не бяха подходящи за *ex vitro* адаптация /Фиг. 17/



Фигура 17. *In vitro* култивиране на *P. veris*: А – покълване на семената на среда съдържаща гибберелинова киселина и кинетин; В, С – млади растения, получени след субкултивиране.

4.5.3.3. Адаптиране на *in vitro* получените растения към условията на околната среда

Получените семеначета *in vivo*, *in vitro* и хидропонно/ от *Alkanna tinctoria*, *Helichrysum arenarium* и *Primula veris* бяха прехвърляни последователно върху субстрат от почва и перлит/вермикулит във фитотронно помещение, оранжерия и опитно поле за адаптиране към условията на околната среда. Растенията и от трите вида се адаптираха успешно /Фиг.18, 1-3/.



Фигура. 18.1. Аклиматизация на хидропонно отгледаните растения от *A. tinctoria*: А) Добре развити розетки, прехвърлени в саксийки с почвен субстрат, във фитотронното помещение; Б) Растения с разклонени стъбла в оранжерията; В) Растения в *ex situ* колекцията на ИБЕИ; Г) Начало на цъфтежа в края на май 2020.



Фигура 18.2. *Ex vitro* адаптирани растения от *H. arenarium*: А) в климатичен шкаф; Б) във фитотронно помещение.



Фигура 18.3. Адаптиране и отглеждане на растенията от *Primula veris* във фитотрон (на вермикулит и в почвена смес)

4.5.3.4. Култивиране на целевите видове в хидропонни системи.

В рамките на настоящия проект, чрез техниките на хидропонното култивиране, успешно бяха отгледани растения получени от предварително стимулирани семена на *A. tinctoria* /върху Cutting board хидропонната система - Фиг. 19/

Тестването на възможностите за размножаване чрез хидропонни технологии беше проведено и върху червена боровинка (*Vaccinium vitis-idaea* L.), използвана като референтен вид, от същото семейство, също включен в Списъка на видовете лечебни растения под специален режим на опазване и ползване в България, базиран на Закона за лечебните растения (2000), участващ заедно с Мечото грозде в застрашеното местообитание тип 09F2 Високопланински съобщества. Подобно на мечото грозде показва бавен растеж и развитие. За разлика от мечото грозде, при което хидропонното отглеждане не се оказва подходяща техника, при червената боровинка, на използваната Flood & Drain (F&D) тип хидропонна система се вкорениха 32 резника, 62,5% се аклиматизираха при оранжерийни условия, нарастнаха успешно и стигнаха да фаза на цъфтеж /Фиг.20/.



Фигура. 19. Растения от *A. tinctoria* с мощна коренова система, при поставяне на поничи на Cutting board хидропонната система: А) изглед отгоре; Б) изглед отдолу; В) цяло растение, готово за прехвърляне от хидропонната система в саксийка с почвен субстрат.



Фигура. 20. Резници от мечо грозде на Flood and Drain хидропонна система.

Заклучение:

-Разработена е успешна технология за отглеждане на *A. tinctoria* в култура чрез комбиниране на предварителното стимулиране покълването на семената и хидропонно отглеждане на получените семеначета. Създадената е пилотна култура на опитните площи на ИБЕИ може да послужи като основа за разработване на ефективни протоколи за култивиране на вида при контролирани условия.

-Преодоляна е изключително ниската кълняемост на семената на *P.veris* чрез предварително стимулиране на семената чрез третирането им с комбинация от стимулиращи фактори. На базата на това е установен протокол за култивиране на вида.

-Установен е протокол за *in vitro* култивиране на *H. arenarium*. Като оптимален се оказва методът за регенерация чрез директна органогенеза. Този метод е подходящ за прилагане за бързото размножаване на вида за целите на отглеждането му в култура, тъй като получените растения запазват изходното си пloidно ниво.

-Установени са условията за прилагане на техниките за хидропонно отглеждане при храстовидни растения.

5.ОБОБЩЕНИЕ

При изпълнение на дейностите свързани с изпълнението на настоящия проект са получени следните резултати:

- Установено е разпространението на *Alkanna tinctoria* и *Helichrysum arenarium* в България.
- Теренните изследвания доказаха необходимостта от култивиране на целевите видове с цел осигуряване на суровина за фармацевтичната промишленост.
- Създадени са *ex situ* колекции от изследваните видове в оранжерията и опитните площи на ИБЕИ БАН и АУ Пловдив, които могат да послужат като източник на изходен материал за тяхното култивиране.
- Определен е метаболитният профил на популациите на *Alkanna tinctoria* от различни фитогеографски райони на България: Струмска долина, Дунавска равнина и Източни Родопи. Идентифицирано е количеството алканин при отделните популации и е сравнено с това при търговски продукт-корени от *A. tinctoria*, което при пулациите от Струмска долина е близко и даже надвишава по количество, установеното в търговския продукт.
- Проведено е сравнително изследване на химичния профил на надземните части на *A.tinctoria*, което е първо по рода си.
- За първи път се съобщава за наличието на ононитол в надземните части на вида, както и на фенолна киселина, в надземните части, и в корените на *A.tinctoria*
- Установен е качественият и количественият състав на етеричното масло на българските популации на *Helichrysum arenarium*. Техният химичен профил е оценен като нов хемотип за вида, с основни компоненти α -пинен (34,64–44,35%) и сабинен (10,63–11,1%).
- Направен е сравнителен анализ на състава на етеричното масло на *H. arenarium* с този на *H. italicum*, който показва, че двата вида имат специфичен профил на етеричното масло: монотерпените (α -пинен, сабинен) са преобладаващият клас съединения в етеричното масло на *H. arenarium*, докато в етеричното масло на *H. italicum* доминират сесквитерпените (нерил ацетат и β -химахален).
- Идентифицирани са ексудатните флавоноиди от листата на *Primula veris* и е оценен техния капацитет като източник на биоцидна активност /като инхибитори на покълването на семената на плевели по културните растения/.
- Установена е инхибиторна активност на флавоноиди изолирани от цветове на *Helichrysum arenarium* върху покълването на *Lolium perenne* L. /плевел по културните растения/, което подкрепя подобни резултати с ексудати от други ароматни и етеричномаслени растения и затвърждава извода, че ексудатите от такива растения също могат успешно да се прилагат като средства с биоцидна активност при контрола на плевелите по културните растения.
- Идентифицирани са биоактивните съединения в метаноловите екстракти на листни проби от български популации на *A. uva ursi*.
- Установен е генетичният профил на избрани популации на целевите видове, които и при четирите изследвани вида не показва висока междупопулационна вариабилност.
- Определен е размерът на генома при четирите целеви вида, който не се променя при

отделните популации и при четирите изследвани вида и е указание за стабилност на тяхното пloidно ниво.

- Съобщеният размер на генома при *H. arenarium* е първото съобщение за размера на генома не само за български популации, но изобщо за вида.
 - Разкрити са особеностите на структурите и процесите водещи до образуване на полен и семена, които са предпоставка за успешно репродуциране на популациите на изследваните видове и респективно запазване на техните размери.
 - Направена е оценка на репродуктивния потенциал на популациите на целевите видове, който се влияе от промяната в условията на околната среда. .
 - Получените резултати от направения генетичен профил и установени особености на репродуктивната биология показват, че ограниченото разпространение на *A. tinctoria* и *H. arenarium* в България са резултат от ниската генетична вариабилност на популациите на двата вида и ниска пластичност на репродуктивния апарат, които обуславят една по-ниска адаптивност към условията на околната среда.
 - Установен е протокол за размножаване *in vitro* на *H.arenarium* чрез директна органогенеза. Той е подходящ метод за култивиране не само на този вид, но и на други ценни диворастящи видове растения, тъй като при прилагането му не се променя размерът на генома, запазва се пloidното ниво на изходните растения, респективно тяхното качество.
 - Установени са условията за *ex situ* отглеждане на четирите целеви вида, както следва:
 - *Alkanna tinctoria* – чрез хидропонно култивиране
 - *Helichryzum arenarium* – чрез въвеждане в култура *in vitro*
 - *Arctostaphylus uva-ursi* – чрез резници
 - *Primula veris* – чрез стимулиране покълването на семената *in vivo*
- За три от тях са разработени протоколи за отглеждане в агрокултура:

- *Alkanna tinctoria*: размножаване чрез семена третирани с гибберелинова киселина и монохроматична светлина за стимулиране на покълването; прехвърляне на получените семеначета върху Cutting board хидропонна система за доразвитие в млади растения; адаптиране на младите растения към почвен субстрат в саксии, последователно във фитотронно помещение и в оранжерия (за укрепване и образуване на разклонени стъбла); пренасяне и засаждане на растенията на открито.
- *Helichryzum arenarium*: размножаване *in vitro* от семена върху основна хранителна среда MS свободна от растежни регулатори и с 30 g/l захароза; прехвърляне на получените семеначета на среда MS-20 (без растежни регулатори) и с 20г/л захароза, за доизрастване и образуване на корени; адаптиране на младите растения към почвен субстрат в саксии, последователно във фитотронно помещение и в оранжерия; пренасяне и засаждане на растенията на открито.
- *Primula veris*: стимулиране покълването на семената *in vivo* чрез комбинираното им третиране с GA3 и монохроматична светлина; адаптиране на получените млади растения към почвен субстрат в саксии, последователно във фитотронно помещение и в оранжерия; пренасяне и засаждане на растенията на открито.

Резултатите от проведеното изследване са представени във:

- **11 публикации:**
- **– 10 излезли от печат:**

Boryanka D. Traykova, Irena D. Grigorova, Marina I. Stanilova, Emil D. Molle, Elina P. Yankova-Tsvetkova. 2020. *Alkanna tinctoria*: An Approach Toward Ex situ Cultivation. Ecol. Balk. Special Edition 3: 107-115. SJR 0.14 **Q4**
http://web.uni-plovdiv.bg/mollov/EB/2020_SE3/107-115_eb.20SE303.pdf
<https://doi.org/10.3390/plants12010111>

Elina Yankova-Tsvetkova, Stoyan Stoyanov, Antonina Vitkova, Ivanka Semerdjieva. On the Distribution of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) in Bulgaria. 2021. Compt. Rendus Acad. Sci. Bulg 74(11): 1599-1606 . SJR (Scopus):0.19 **Q3** IF: 0.329
https://www.proceedings.bas.bg/index_old.html

Yankova-Tsvetkova, E., Yurukova-Grancharova, P., Aneva, I., Zhelev, P. 2021. On the reproductive potential in *Primula veris* L. (Primulaceae): Embryological Features, Pollen and Seed Viability, Genetic Diversity. Plants 10(11) 2296 ISSN: 2223-7747, **Q1**, IF 4.67 (2021)
<https://doi.org/10.3390/plants10112296>

Elina Yankova-Tsvetkova, Petka Yurukova-Grancharova, Rozalia Nikolova. 2022. On the Reproductive Biology of *Alkanna tinctoria* (Boraginaceae) Compt. Rendus Acad. Sci. Bulg 75(7): 1000-1008 SJR (Scopus):0.19 **Q3** IF: 0.329
<https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/issue/view/7>

Zheljazkov, V.D.; Semerdjieva, I.; Yankova-Tsvetkova, E.; Astatkie, T.; Stanev, S.; Dincheva, I.; Kačániová, M. Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. Plants 2022, 11, 951. IF 4.658 **Q1**
<https://doi.org/10.3390/plants11070951>

Marina Stanilova, Boryanka Traykova, Vladimir Vladimirov, Maria Petrova, Ivanka Semerdjieva, Elina Yankova-Tsvetkova. 2022. In vitro Micropropagation of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) as a Tool for Introducing the Species in Agriculture. Compt. Rendus Acad. Sci. Bulg 75(10): 1454-1461 SJR (Scopus):0.19 **Q3** IF: 0.329
<https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/issue/view/10>

Yankova-Tsvetkova, E.; Petrova, M.; Grigorova, I.; Traykova, B.; Stanilova, M. The Establishment of an Ex Situ Collection of *Primula veris* in Bulgaria. Plants 2022, 11, 3018. IF 4.658 **Q1**
<https://doi.org/10.3390/plants11223018>

Nikolova, M.; Aneva, I.; Zhelev, P.; Semerdjieva, I.; Zheljazkov, V.D.; Vladimirov, V.; Stoyanov, S.; Berkov, S.; Yankova-Tsvetkova, E. Metabolic Profiles, Genetic Diversity, and Genome Size of Bulgarian Population of *Alkanna tinctoria*. *Plants* 2023, 12, 111. <https://doi.org/10.3390/plants12010111>

Nikolova M, Yankova-Tsvetkova E., Stefanova, T., Stoyanov, S., Berkov S. Evaluation of *Helichrysum arenarium* flowers exudate as inhibitor on *Lolium perenne* seed germination under laboratory conditions. 2023. *Acta Agrobotanica*, *Acta Agro* 2023;76, DOI: <https://doi.org/10.5586/aa.761>

Milena Nikolova, Elina Yankova-Tsvetkova, Tatyana Stefanova, Strahil Berkov 2023. Exudate flavonoids of *Primula veris* leaves and their inhibitory activity on *Lolium perenne* seed germination. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 76, 3, 388-393 <https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/272/264>

1 подадена за печат

Milena Nikolova, Ina Aneva, Elina Yankova-Tsvetkova, Petar Zhelev, Strahil Berkov 2023. Bioactive compounds of *Arctostaphylos uva-ursi* wild growing populations from Bulgaria. *Biological Communication*

- 2 кратки съобщения:

Elina Yankova Tsvetkova, Stoyan Stoyanov, Antonina Vitkova, Kiril Vassilev, Ivanka Semerdjieva. Notes on the distribution of *Alkanna tinctoria* (L.) Tausch in Bulgaria *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 66 (Suppl 2) 23 - 24 (2020) Online ISSN 1857 – 8969 UDC: 582.929.2-19(497.2)

DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2020.66.04.011 Short communication

Marina Stanilova* Boryanka Traykova, Irena Mincheva, Elina Yankova-Tsvetkova. Soilless propagation of wild *Ericaceae* medicinal shrubs. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 68 (Suppl 2) 213 -214 (2022) Online ISSN 1857 – 8969

DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.04.098 Short communication

- 1 книга

Янкова-Цветкова, Е. Съставител. 2022. Култивиране на видове лечебни растения от Българската флора с ресурсен дефицит. Интел Ентранс, София., 2022, ISBN:978-619-7703-07-8

- **13 постера на 10 научни форума:**

1.13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara Planina Mt.,

20-23 June 2019- 1 постер

1. Yankova-Tsvetkova, E., Berkov, S., Stanilova, M., Yurukova-Grancharova, P., Vitkova, A., Nikolova M., Zhelev, P., Stoyanov, S., Vladimirov, V., Aneva, I., Kozhurahova, A., Traykova, B., Ilinkin, V.1, Nikolova, R., Stefanova, T., Dimitrova, M.1, Semerdjieva, I., Zheljazkov, V. Reproductive potential, metabolic and genetic profile, in situ and ex situ conditions, of medicinal plants species from the Bulgarian flora with resource deficit – scientific base for their cultivation. In Book of Abstracts 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 2019, P.138

2.5th International Congress On Biodiversity: Taxonomy, Speciation And Euro-Mediterranean Biodiversity, 11-13 October 2019 Sofia - 1 постер

2. Elina Yankova-Tsvetkova, Stoyan Stoyanov, Antonina Vitkova, Ivanka Semerdjieva. On the distribution of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (Asteraceae) in Bulgaria
<https://aca.pensoft.net/article/46489/>

3.8th International Conference of Ecologists of Montenegro, 2-6 October 2019, Budva, Montenegro – 1 постер

3. Milena Nikolova, Elina Yankova-Tsvetkova, Vladimir Ilinkin, Strahil Berkov. GC/MS metabolite analysis of the aerial parts of *Alkanna tinctoria* Book of Abstracts ISEM8 October, 2-5, 2019 p.92

4. International Seminar of Ecology 2020 On line seminar 23-24 April 2020 г. – 1 постер

4. Traykova, B., Grigorova, I., Stanilova, M., Molle, E., Yankova-Tsvetkova, E. 2020. *Alkanna tinctoria*: an approach toward ex situ cultivation. Book of Abstracts. International Seminar of Ecology 2020, p. 32

5. II International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL) September 1-3 2020, Edirne, Turkey – 1 постер

5. Nikolova, M., Yankova-Tsvetkova, E., Vitkova, A., Stojan, S., Semerdjieva, I., Berkov, S. Assessment of alkannin content in the roots of Bulgarian populations of *Alkanna tinctoria*. Book of Abstracts. II International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL) September 1-3, 2020, Edirne, Turkey p. 342

6.5th Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, 15-16 april 2021 - 2 posters

6. Yankova-Tsvetkova, E., Yurukova-Grancharova, P, Nikolova, R. 2021. A study on reproductive capacity in *Primula veris* L. (Primulaceae).

https://zenodo.org/record/4641763#.Y_S0NXZByUk

7. Stanilova, M., Petrova, M., Grigorova, I., Traykova, B., Yankova-Tsvetkova, E. 2021. Stimulation of *Primula veris* seeds' germination under in vivo and in vitro conditions

https://zenodo.org/record/4650322#.Y_S1d3ZByUk

7.1st International Conference on Botany and Mycology, Sofia 25–26 October 2021 - 1 poster

8. Stanilova, M., Traykova, B., Vladimirov, V., Petrova, M., Yankova-Tsvetkova, E. 2021 *In vitro* micropropagation of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) as a tool for introducing the species in agroculture. Book of Abstracts. 1st International Conference on Botany and Mycology, Sofia 25–26 October 2021, p. 43

<https://icbotmyco.com/wp-content/uploads/2021/10/BOTMYCO-2021-Abstracts-Book.pdf>

8.8th Balkan Botanical Congress, 4-8 July 2022, Athens, Greece: - 2 posters

9. Nikolova M.*, Aneva I., Yankova-Tsvetkova E., Berkov S. Bioactive compounds of *Arctostaphylos uva-ursi* growing in Bulgaria. 8th Balkan Botanical Congress, 4-8 July 2022. Book of abstracts, pp: 76.

10. Semerdjieva I.1,2*, Zheljazkov V.D.3, **Yankova-Tsvetkova E.**, Dincheva I., Astatkie T. Chemical profile of essential oil of *Helichrysum arenarium* (L) Moench. distributed in Bulgaria. 8th Balkan Botanical Congress, 4-8 July 2022. Book of abstracts, pp: 79.

https://www.uoa.gr/fileadmin/user_upload/PDF-files/ekdilwseis/Synedria/2022/0107_balkan_botanical_congress_programma.pdf

9.2nd International Conference on Botany and Mycology, 19–20 September 2022, Sofia, Bulgaria - - 2 постера

- 11.Elina Yankova-Tsvetkova* & Rozalia Nikolova. On the reproductive biology of *Arctostaphylus uva-ursi* (Ericaceae). 2nd International Conference on Botany and Mycology, 19–20 September 2022. Book of abstracts, p. 23.
- 12.Milena Nikolova, Elina Yankova-Tsvetkova*, Tatyana Stefanova, Marina Dimitrova, Strahil Berkov. Exudate compounds of *Primula veris* leaves and their biological activity 2nd International Conference on Botany and Mycology, 19–20 September 2022. Book of abstracts, p. 34.

<https://icbotmyco.com/wp-content/uploads/2022/09/BOTMYCO-2022-Abstracts-Book.pdf>

10.11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries 2022 (CMAPESEC 2022), 6-10 October 2022 in Ohrid, Republic of North Macedonia -

1постер

- 13.Marina Stanilova*, Boryanka Traykova, Irena Mincheva, Elina Yankova-Tsvetkova. Soilless propagation of wild Ericaceae medicinal shrubs, 11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries 2022 (CMAPESEC 2022), 6-10 October 2022 in Ohrid, Republic of North Macedonia, Book of abstracts, pp: 213-214.

http://cmapseec.mfd.org.mk/wp-content/uploads/2022/12/Supplement-Issue_68_2_2022_CMAPESEC.pdf

По време на теренните изследвания във връзка с изпълнение на задачите на РП1, е установен нов за българската флора вид, който е описан в следната публикация, с благодарности към проекта:

Stoyan Stoyanov, S., Barzov, Zh. 2020. *Papaver nigrotinctum*: first records for the flora of Bulgaria and Republic of North Macedonia. – Phytologia Balcanica 26(1): 35–42.