

ВИСША АТЕСТАЦИОННА КОМИСИЯ
СНС ПО ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ НА РАСТЕНИЯТА

Калина Монева Данова

***Ин vitro* култивиране и вторични метаболити във видове
от род *Hypericum* и *Pulsatilla*,
криопрезервация на *Hypericum rumeliacum* Boiss.**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователно научната степен "Доктор"

Научен ръководител:

Доц. д-р Венета Михова Капчина-Тотева

Рецензенти:

Проф. дбн Иван Йорданов

Доц. д-р Евгени Ананиев

Научна специалност:

01.06.16 - Физиология на растенията

София 2010

Използвани съкращения

ABA	Абсцисиева киселина
APx	Аскорбат пероксидаза
Asc	Аскорбат
BA	N ⁶ - бензиладенин
CAT	Каталаза
Chl a	Хлорофил а
Chl b	Хлорофил б
Chl tot	Общо количество на хлорофилите
Chl a/b	Съотношение хлорофил а/ хлорофил б
CK	Цитокинини
Dehasc	Дехидроаскорбат
DW	Сухо тегло
FW	Свежо тегло
GR	Гваякол редуктаза
GSH	Гедуциран глутатион
GSSH	Окислен глутатион
HGD	Брой хиперицинови жлези на mm ²
HGN	Брой хиперицинови жлези на лист
H ₂ O	Вода
H ₂ O ₂	Водороден пероксид
HPLC	Високоефективна течна хроматография
Hyp	Хиперицин
psHyp	Псевдохиперицин
totHyp	Общо количество хиперицини
IBA	Индол-3-маслена киселина
IC	Индекс на компактност
LA	Листна площ [mm ²]
LC-MS	Течна хроматография – мас-спектроскопия
LPLC	Препаративна течна хроматография тип “Lobar”.
MDA	Малондиалдехид
MeOH	Метанол
MS	Хранителна среда на Murashige и Skoog
NAA	Нафтилоцетна киселина
NMR	Ядрено магнитен резонанс
PAL	Фенилаланин амонио лиаза

Увод

Биотехнологичната разработка на видове с висок биосинтетичен капацитет *ин vitro*, или с потенциала за биосинтез на нови вещества, ще доведе до установяването на стабилна *ин vitro* система за контролиран добив на фармакологично ценни вторични метаболити.

Видовете от род *Pulsatilla* Miller се използват широко в традиционната медицина за лечението на ентерити и като противовъзпалителни, антиспазматични и противотуморни средства. Въпреки това, в литературата все още се срещат ограничен брой съобщения за култивиране на *Pulsatilla* в *ин vitro* условия, като всички те са насочени единствено към микроразмножаването на редки и застрашени представители на рода. Досега в достъпната литература не са открити съобщения за съдържанието на вторични метаболити в *ин vitro* култури на видове от род *Pulsatilla*.

Представителите на род *Hypericum* L. се използват както в народната, така и в официалната медицина. Нафтодиантроновото производно хиперицин, характерно за еволюционно по-напредналите секции, се изучава широко поради антидепресивната, противотуморната и противовирусната му активност. В сравнителни проучвания между видове от род *Hypericum* е установено, че представителите на секция *Drosocarpium* Spach се характеризират с най-високи количества на хиперицин и псевдохиперицин. В литературата се изказват предположения за “богати на хиперицин” видове от тази секция (напр. *H. boissieri*, *H. barbatum* и *H. rumeliacum*), които биха могли да съдържат 2-4 пъти повече хиперицин от *H. perforatum*.

Въпреки големия брой видове (над 400), както и широкото проучване на добива на вторични метаболити *ин vitro*, на практика по литературни данни биотехнологично са разработени едва 12 вида от род *Hypericum*, като преобладаващата част от съобщенията се отнасят до *H. perforatum*. Сред разработените в култура видове не фигурират представители от секцията *Drosocarpium*.

Проучването на съдържанието на вторични метаболити при неизследвани досега ендемични видове от род *Pulsatilla*, ще допълни познанията относно потенциала на неговите представители като нов източник на терапевтично ценни вещества, а биотехнологичната им разработка – за осигуряването на стабилна *in vitro* система за изучаването на техния биосинтез и за стандартизирания им добив. Биотехнологичната разработка на представители от секцията *Drosocarpium* на род *Hypericum*, ще доведе до подбора на интересни обекти с по-висок потенциал за синтеза на хиперицини *in vitro*, а сравнението с други видове с по-ниска или липсваща продукция на хиперицин и псевдохиперицин, ще спомогне за по-пълното разбиране на факторите, имащи отношение към добива на тези вещества в условията на *in vitro* култура.

Оценката на въздействието на криопрезервацията върху физиологичния статус и биосинтетичния капацитет на регенерираните растения ще задълбочи познанията върху този нов за България метод и ще разшири набора от подходи за консервацията на високопродуктивни линии *in vitro*. От друга страна, оценката на въздействието на подготвителните етапи при криопрезервацията върху физиологичния статус на регенерираните растения, ще спомогне за целенасоченото и предсказуемо, а не чисто емпиричното подобряване на протокола. Изследването на физиолого-биохимичните процеси, протичащи при различните етапи на криопрезервацията, ще допринесе за успешното практическо приложение на метода също и върху други видове с консервационна значимост или селектирани линии с ценни биосинтетични качества.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на настоящата дисертация е въвеждане в *ин vitro* култура на ценни за нашата флора растителни видове от род *Hypericum* и *Pulsatilla* и оценка на възможността да бъдат използвани в лабораторни условия като източник на вторични метаболити с терапевтично значение.

За постигането на тази цел трябва да се решат следните задачи:

1. Изследване на съдържанието на вторични метаболити с фенолна природа в надземните части на балканския ендемит *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*.

2. Въвеждане в *ин vitro* култура на трите балкански ендемита: *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae* и изследване на влиянието на цитокинините и ауксините върху *ин vitro* размножаването и биосинтеза на вторични метаболити.

3. Въвеждане в *ин vitro* култура на *Hypericum rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum*, като моделна система съответно на видове с висока, ниска и липсваща продукция на хиперицини. Сравнение на съдържанието на вторични метаболити в проби от естествените находища и индуцираните култури от тези три вида.

4. Изследване на влиянието на условията за култивиране *ин vitro* върху съдържанието на хиперицин, псевдохиперицин, феноли и флавоноиди в култура от надземни части при трите изследвани вида от род *Hypericum*.

5. Изследване на влиянието на растежните регулатори върху морфогенезата и количеството на фенолни съединения при *H. rumeliacum* *ин vitro*.

6. Разработване на биотехнологичен подход за *ин vitro* размножаване на *H. rumeliacum*, който да обезпечи ефективното натрупване на големи количества биомаса и синтез на феноли и флавоноиди *ин vitro*.

7. Оценка на възможността за криопрезервация и съхранение на *H. rumeliacum* при температура -196°C, като метод за запазване на биосинтетичния капацитет на ценни високопродуктивни линии след регенерация *ин vitro*.

Материали и методи

1. Растителен материал.

Използван е растителен материал от *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea*, *P. slaviankae*, *Hypericum rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum*. Растителният материал е събран от естествените находища от докторантката и е идентифициран от ст.н.с. II ст. Димитър Димитров, Национален Природонаучен Музей, БАН. Хербарийни образци от видовете са депозиран в Института по Ботаника, БАН.

Културите от надземни части от видовете от род *Pulsatilla* са иницирани от стерилно покълнали семена, а от видовете от род *Hypericum* – от стерилизирани *ex situ* стъблени експланти. Разглежданите в работата хранителни среди са базирани на формулите на Murashige & Skoog (1962) и Gamborg (1968).

2. Методи.

2.1. Охарактеризиране на растежа в условията на *ин vitro* култура на шестте вида чрез определяне на: брой формиращи розетки/разклонения, брой листа, формиращи на розетка/разклонение, височина на розетките/разклоненията в [cm], IC – индекс на компактност (за изследваните видове от род *Hypericum*; изчислен е по формулата: $IC = \text{среден брой двойки листа} / \text{средна дължина на стъблото [cm]}$ (Bertoli *et al.* 2008), листна площ (LA) [mm²] при *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum* (измерва се чрез пре-калибрирания дигитален образ при увеличение 1:10, на всеки от измерваните листа); брой (HGN) и гъстота на разпределението (HGD) на хиперициновите жлези при *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum*. Хиперициновите жлези се изброяват с помощта на нетрайни микроскопски препарати от цял лист от *ин vitro* култивиран *Hypericum*, фиксиран с глицерин. За изброяването им, хиперициновите жлези се визуализират на светлинен микроскоп при увеличение (x 40). Гъстотата на разпределение на хиперициновите жлези (HGD) се изчислява като брой на хиперициновите жлези на единица листна площ [mm²]: $HGD = HGN/mm^2$; *свежо/сухо тегло, калусогенез*.

2.2. Количествено определяне на пластидни пигменти (Moran 1982)

- 2.3. Определяне на общ белтък Lowry *et al.* (1951)
- 2.4. Определяне на активността на фенилалан-амониалиаза: PAL (EC 4.3.1.24) (Yuan *et al.* 2002)
- 2.5. Каталаза: CAT (EC1.11.1.6) (Aebi 1984)
- 2.6. Глутатион редуктаза: GR (EC 1.6.4.2) (Sherwin & Farrant 1998)
- 2.7. Аскорбат пероксидаза: AP (EC 1.11.1.11) (Nakano & Asada 1981)
- 2.8. Определяне на общото количество на окислен (GSSH) и редуциран (GSH) глутатион (Doulis *et al.* 1997)
- 2.9. Определяне на общото количество на аскорбата (Asc) и дехидроаскорбата (DehAsc) (Foyer *et al.* 1983)
- 2.10. Определяне на количеството на малондиалдехид (MDA) и водороден пероксид (H_2O_2) съответно (Dhindsa *et al.* 1981) и (Jessup *et al.* 1994)
- 2.11. Определяне на общо количество разтворими захари (Dubois *et al.* 1956)
- 2.12. Количествено определяне на антоциани (Lohachoompol *et al.* 2004)
- 2.13. Количествено определяне на феноли (Singleton *et al.* 1999)
- 2.14. Количествено определяне на флавоноиди (Zhishen 1999)
- 2.15. Извличане, пречистване, разделяне и идентифициране на индивидуални вещества от *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*: материалът (200g) се екстрахира последователно с хексан и хлороформ на апарат на Сокслет. След това обезмасленият материал се извлича с метанол чрез студена мацерация и метанолният извлек се разделя и пречиства до получаването на индивидуални вещества по следната схема:

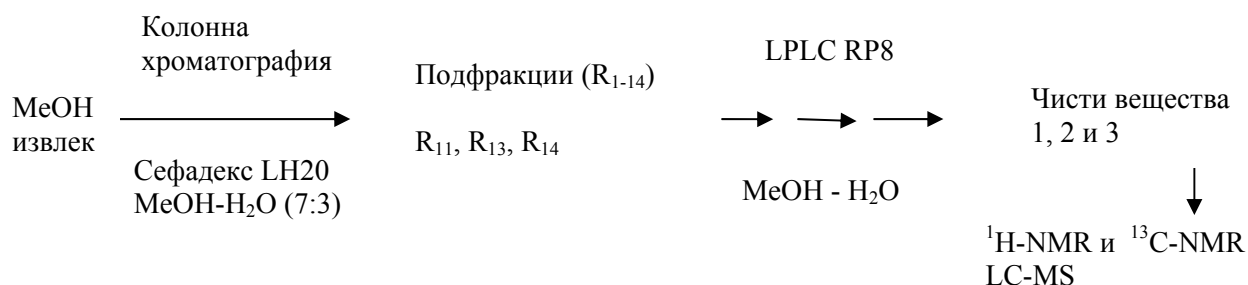


Схема 1. Опростена схема на разделянето, пречистването, изолирането и идентифицирането на индивидуални вещества от метанолния извлек на надземните части на *P. montana* ssp. *balcana*.

Полученият метанолен извлек (2.251g) се пречиства чрез колонна хроматография през Сефадекс LH20. Подвижната фаза на колоната е MeOH-H₂O (7:3). След ТСХ сравнение (силикагел 60 GF₂₅₄, и диагностиращ реагент NTS/PEG), са получени 14 подфракции (R₁₋₁₄). В настоящата дисертация се описва разделянето и пречистването на подфракции R₁₁, R₁₃ и R₁₄ до получаването на вещества съответно 1, 2 и 3. Получените чисти вещества се определят чрез ¹H-NMR (250MHz), ¹³C-NMR (62MHz) и LC-MS.

2.16. HPLC анализ на хиперицин и псевдохиперицин: работено е по модифициран HPLC метод за едновременно определяне на хиперицин/псевдохиперицин (Häberlein *et al.* 1992; Krämer & Wiartall 1992; Balogh & Li 1999).

2.17. Светлинно-микроскопско изследване на хистологични препарати при *H. rumeliacum*: (Němec 1962)

2.18. Криопрезервация на *H. rumeliacum* (Danova *et al.* 2009b, c, d; Danova & Kapchina-Toteva 2009)

2.18.1. Метод на бавното охлаждане

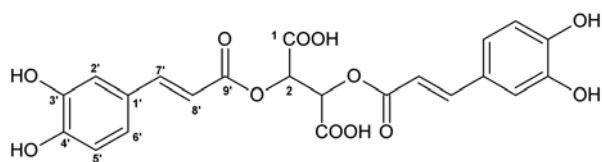
2.18.2. Метод на витрификацията

Резултати

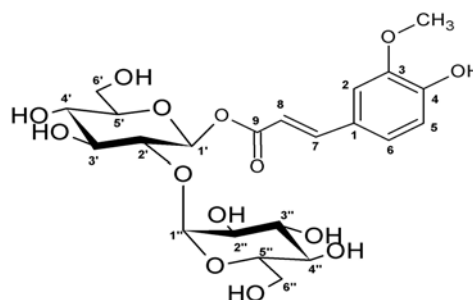
1. Идентифициране на изолираните фенолни съединения от метанолния извлек на надземните части на *P. montana* ssp. *balcana* от естественото находище

В резултат на проведените изследвания са идентифицирани: **Вещество 1:** цикориева киселина (дикафеилвинена киселина) (Фигура 1); **Вещество 2:** 1'-феруил-глюкопиранозил (1→2) глюкоза (Фигура 2); **Вещество 3:** кафеена киселина (Фигура 3).

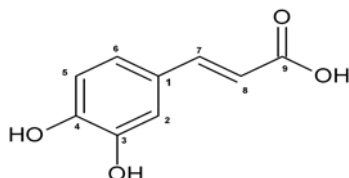
Цикориевата киселина стимулира фагоцитозата, потиска хиалуронидазната активност в човешкото тяло, предпазва колагена от увреждащото действие на свободните радикали, инхибира действието на HIV-1 интегразата (Bauer 1999, 2000; Perry *et al.* 2001).



Фигура 1. Цикориева киселина - **вещество 1**



Фигура 2. 1'-феруил-глюкопиранозил (1→2) глюкоза - **вещество 2.**



Фигура 3. Кафеена киселина - **вещество 3**

Феруловата киселина е широко разпространена в растителното царство и има изразени антиоксидантни свойства (Ou & Kwok 2004; Lin *et al.* 2005). Установено е, че **кафеената киселина** играе активна роля в превенцията на рака на кожата (Kang *et al.* 2009).

Цикориевата киселина е характерна за *Cichorium intybus*, *Echinacea palida*, *E. purpurea* и *E. angustifolia*. Досега тя не е изолирана от представител на род *Pulsatilla*. В настоящата работа се прави първото съобщение за нейното идентифициране в надземните части на *P. montana* ssp. *balcana*. Изолираният в настоящата работа от надземните части на *P. montana* ssp. *balcana* ферулоилов дигликозид е ново природно съединение.

2. Влияние на растежните регулатори върху *Pulsatilla slaviankae*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. montana* ssp. *balcana* и *in vitro*

Култури от надземни части от трите изследвани вида от род *Pulsatilla* бяха сравнени първоначално в три варианта хранителни среди, представени на Таблица 1. Бяха определени количеството на антоциани (Фигура 4), фенолни и флавоноидни съединения и количество на хлорофилните пигменти (съотношение chl a/b) (Фигура 5).

Таблица 1. Състав на хранителните среди, използвани за изучаване на въздействието на БА и IBA върху количеството на пластидните пигменти и синтеза на фенолни съединения при *ин vitro* култивираните *P. montana* ssp. *balcana*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae*.

Хранителна среда	Състав на хранителната среда
MS	Контролна MS среда без добавени растежни регулатори
HP2	MS + 0,2mg/l BA
HP3	MS + 0,2mg/l BA + 0,1 mg/l IBA

Впоследствие изследването беше разширено, като *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae* бяха култивирани в 11 варианта хранителни среди при комбинация на СК и ауксини (Таблица 2):

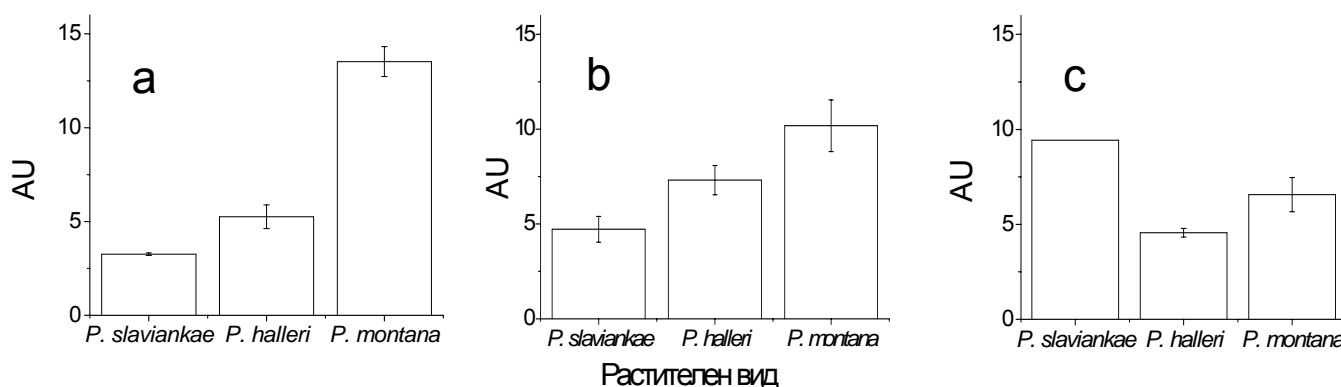
Таблица 2. Състав на хранителните среди, използвани за изучаване на въздействието на БА, NAA и IBA върху *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae* в условията на *ин vitro* култура.

Хранителна среда	Състав на хранителната среда
1	Контролна MS среда без добавени растежни регулатори
2	0.2 mg/l BA
3	0.7 mg/l BA
4	0.2 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA
5	0.2 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA
6	0.2 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
7	0.2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA
8	0.7 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA
9	0.7 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA
10	0.7 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
11	0.7 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA

При съответните 11 варианта хранителни среди за *P. halleri* и *P. slaviankae* бяха определени морфометрични показатели (Фигура 6), количество на

хлорофилните пигменти (chl a/b) и вторични метаболити с фенолна структура (Фигура 7).

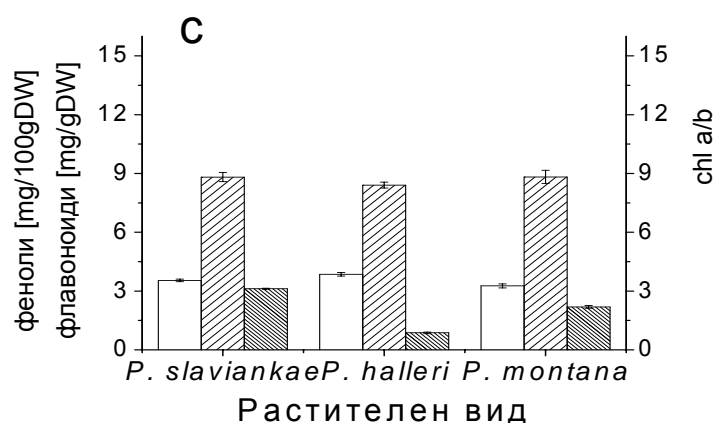
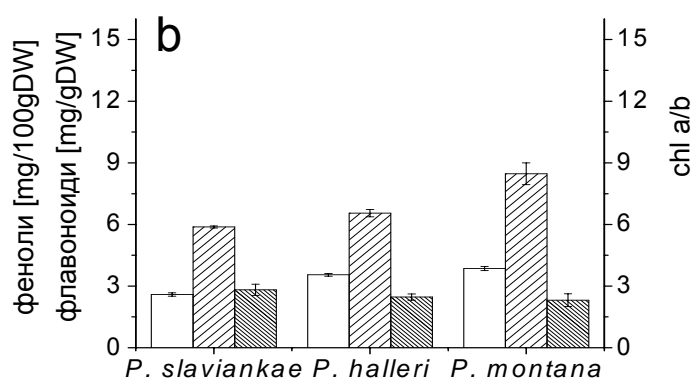
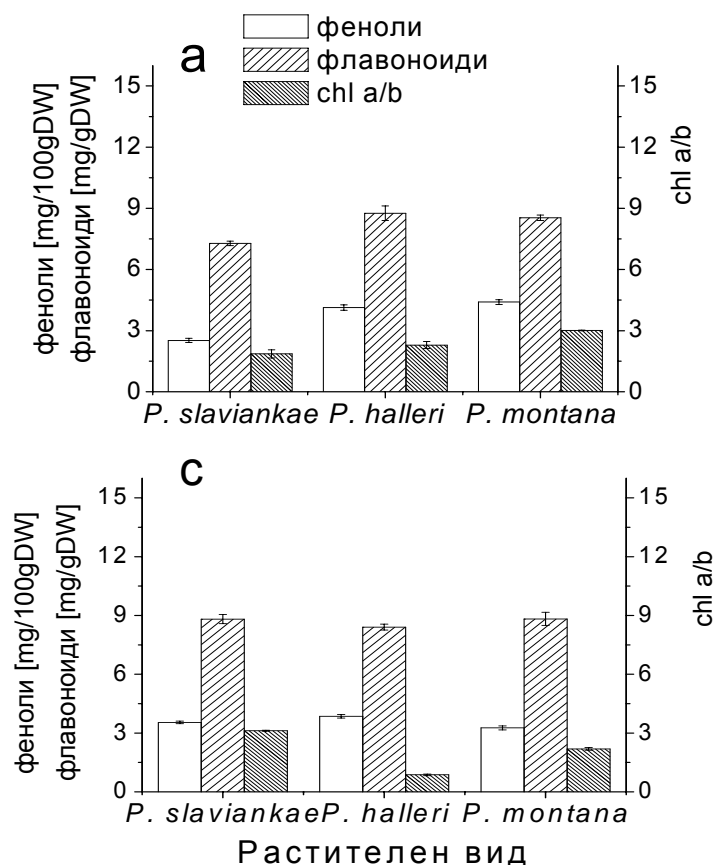
В основната MS хранителна среда без въздействието на растежните регулатори, съдържанието на антоцианите, както и общите фенолни и флавоноидни съединения, са значително по-високи при *P. halleri* и *P. montana*, в сравнение с установените при *P. slaviankae* (Фигури 4 и 5-a). Същите съотношения се наблюдават и при прибавянето на ВА към хранителната среда (вариант НР2) (Фигури 4 и 5-b).



Фигура 4. Влияние на ВА и ИВА в състава на хранителната среда, върху съдържанието на общи антоциани в условия на *in vitro* култивиране при *P. slaviankae*, *P. halleri* и *P. montana* в MS (a), НР2 (b) и НР3 (c) хранителна среда. Съдържанието на общите антоциани е изразено в относителни единици $AU = A_{535}/gDW$.

Беше установено, че след добавянето на ауксин + СК към хранителната среда, (вариант НР3), като цяло не се наблюдават значителни различия между трите изследвани вида по отношение на количеството на фенолите и флавоноидите (Фигура 5-с), като единствено количествата на антоцианите при *P. slaviankae* са завишени в сравнение с останалите два вида (Фигура 4-с).

При сравняване на общите количества на флавоноидите при различните варианти хранителни среди за всеки даден вид (Фигура 5-a, b и c), се вижда, че при *P. halleri* и *P. slaviankae* се наблюдава понижение на техните количества при вариантите хранителни среди с добавка на ВА (НР2), в сравнение с контролните, MS и с НР3 варианти хранителни среди. Наблюдаваните различия не са значими за *P. montana*.



Фигура 5. Влияние на ВА и ИВА в хранителната среда върху съдържанието на общи феноли, флавоноиди и хлорофилни пигменти (съотношение chl a/b) в условия на *in vitro* култивиране при *P. slaviankae*, *P. halleri* и *P. montana* в MS (a), HP2 (b) и HP3 (c) хранителна среда.

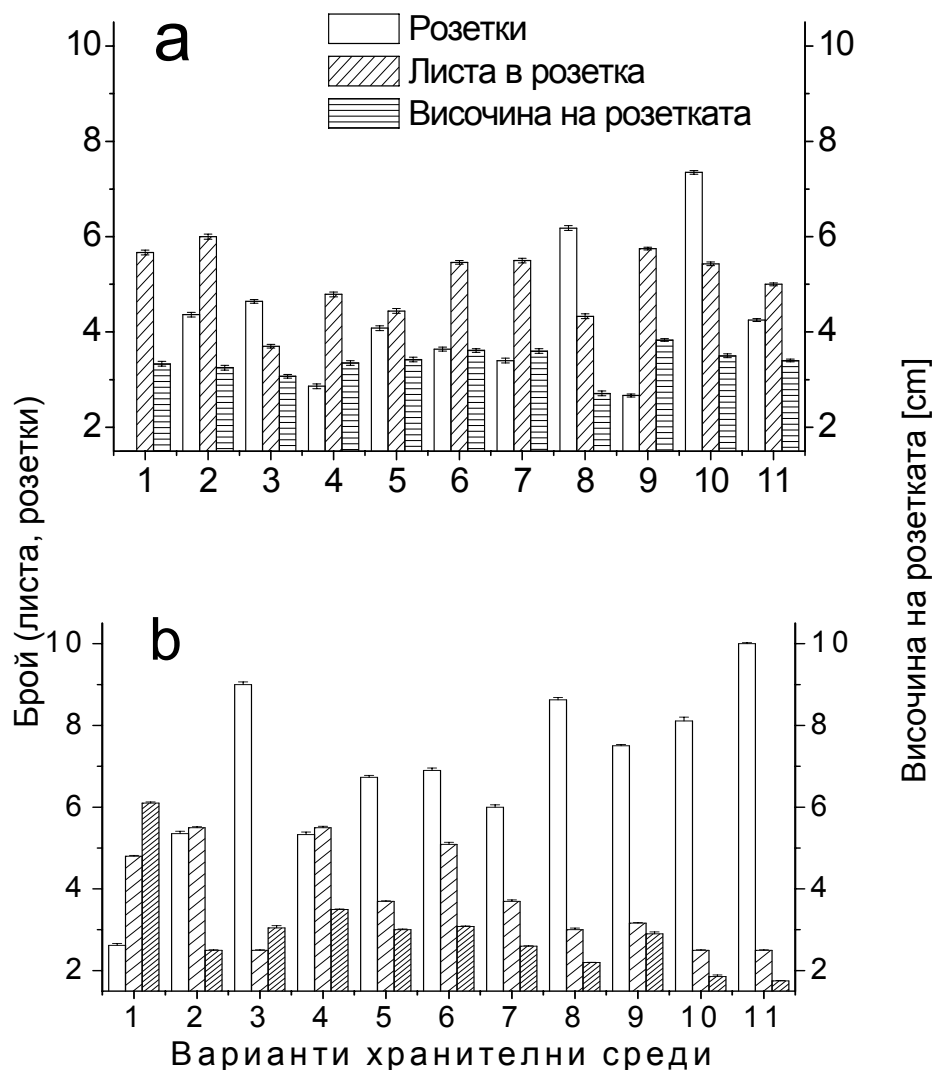
Въз основа на проведеното количествено определяне на пластидните пигменти (съотношение chl a/b) (Фигура 5-а, b и c), са установени и следните зависимости:

- Съотношението chl a/b за *P. slaviankae* е най-високо при вариант HP3. Както вече беше отбелязано, установените количества на вторичните метаболити при *P. slaviankae* също са най-високи при вариант HP3.

- При *P. halleri* отношението chl a/b е високо както при MS, така и при среда HP2, като не се наблюдават значими различия за този параметър между двата варианта. При *P. halleri*, количеството на антоцианите е най-високо при HP2, а фенолните и флавоноидни съединения – при вариант MS.

- При *P. montana* високо съотношение chl a/b също така се наблюдава при вариантите MS и HP2 без да има статистически значими различия при тях. При *P. montana*, количествата на антоцианите и фенолите са най-високи при MS хранителна среда, докато измерените количества флавоноиди не показват значими различия при трите варианта среди.

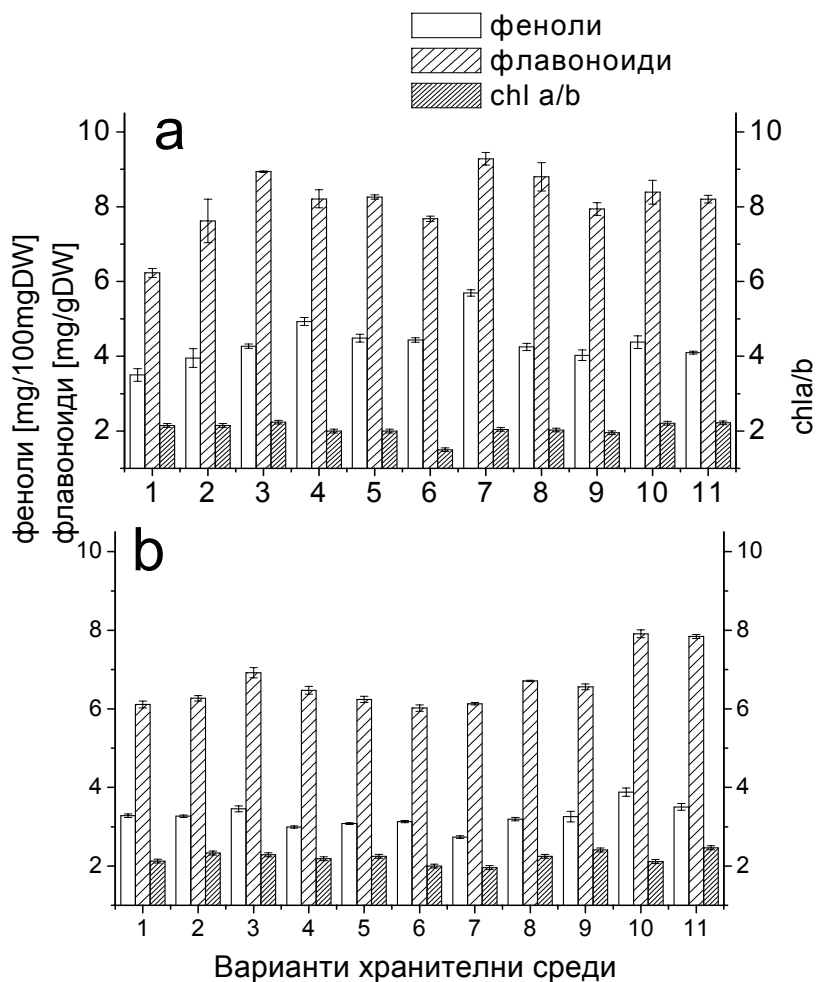
Както се вижда от Таблица 3, както при самостоятелното действие (варианти 2 и 3), така и при високата концентрация на ВА (8, 9, 10 и 11), съотношението FW/DW се повишава значително спрямо контролите (1), което е индикация за натрупването на повече вода в растителната тъкан под въздействието на СК.



Фигура 6. Влияние на ауксини и цитокинини (СК) върху основните морфометрични показатели при *P. halleri* (а) и *P. slaviankae* (б), развиващи се *ин vitro*.

Този ефект е съпроводен и със значително повишаване на броя на формираните розетки и намаляване на височината им в сравнение с контролните варианти без добавени РР (Фигура 6-а и б). Тези наблюдения са валидни и при двата изследвани вида, като прави впечатление по-високата чувствителност към тестваните концентрации на РР при *P. slaviankae* в сравнение с *P. halleri* (по-

силно изразено завишение на FW/DW, увеличаване на броя на формираните розетки и депресиране на височината, в сравнение с контролните варианти).



Фигура 7. Влияние на ауксини и СК върху съдържанието на феноли, флавоноиди и пластидни пигменти (съотношение chl a/b) при *P. halleri* (a) и *P. slaviankae* (b).

Беше установено, че добавянето на ауксин в по-високата концентрация (0.5mg/l независимо от вида му), намалява оводняването на формираните розетки, като този ефект е по-добре изразен при ниските концентрации на ВА (Таблица 3). И при двата растителни вида, броят на формираните листа в розетка е завишен при контролния вариант без РР (1), както и при 0,2mg/l ВА (2), а за *P. slaviankae* и при 0,2mg/l ВА с добавяне на 0,1mg/l и 0,5mg/l IBA (варианти 4 и 6). При *P. slaviankae* прави впечатление, цялостно по-малкият брой листа в една розетка в сравнение с *P. halleri* (Фигура 6-а и b).

Таблица 3. Съотношение FW/DW при единадесетте варианта хранителни среди с комбинация от PP при култура от надземни части на *P. halleri* и *P. slaviankae*.

Вариант хранителна среда	<i>P. halleri</i> [FW/DW]	<i>P. slaviankae</i> [FW/DW]
1 – MS	6.67 (±0.55)	6.12 (±0.33)
2 – MS + 0.2 mg/l BA	10.63 (±0.02)	12.44 (±0.67)
3 – MS + 0,7 mg/l BA	10.81 (±0.05)	17.68 (±1.02)
4 - MS + 0,2mg/l BA + 0,1mg/l IBA	7.91 (±.44)	12.8 (±0.18)
5 - MS + 0,2mg/l BA + 0,5mg/l IBA	7.75 (±0.11)	13.35 (±.033)
6 - MS + 0,2mg/l BA + 0,1mg/l NAA	8.01 (±0.4)	13.14 (±0.94)
7 - MS + 0,2mg/l BA + 0,5mg/l NAA	8.88 (±0.31)	11.65 (±0.8)
8 - MS + 0,7 mg/l BA + 0,1mg/l IBA	12.91 (±0.73)	19.04 (±0.88)
9 - MS + 0,7mg/l BA + 0,5mg/l IBA	11.76 (±2.05)	15.25 (±1.14)
10 - MS + 0,7 mg/l BA + 0,1mg/l NAA	15.1 (±0.56)	17.12 (±0.15)
11 - MS + 0,7mg/l BA + 0,5mg/l NAA	12.68 (±0.44)	19.35 (±0.98)

Въз основа на установеното повишено количественото съдържание на вторични метаболити с фенолна структура, бяха подбрани следните варианти хранителни среди:

Завишена продукция на фенолни и флавоноидни съединения при P. halleri:

- 0,2mg/l BA + 0,1 IBA (4)
- 0,2mg/l BA + 0,5mg/l NAA (7)
- 0,7mg/l BA + 0,1mg/l NAA (8)

Завишена продукция на фенолни и флавоноидни съединения при P. slaviankae:

- 0,7mg/l BA (3)
- 0,7mg/l BA + 0,1 mg/l NAA (10)
- 0,7mg/l BA + 0,5 mg/l NAA (11)

Въз основа на проведените експерименти, направените разсъждения относно количествата на пластидните пигменти и получените резултати по отношение на количественото съдържание на фенолни и флавоноидни съединения, биха могли да се направят следните изводи:

- При изследваните в настоящата работа вторични метаболити с фенолна структура, за проучените от нас видове от род *Pulsatilla*, отговорът на влиянието на растежните регулатори е видово-специфичен;

- При вариантите с повишено съдържание на антоциани при *P. montana* и фенолни и флавоноидни съединения при *P. slaviankae* се наблюдава и повишение на chl a/b.

- При *P. slaviankae*, вариантите с високо съдържание на феноли и флавоноиди корелират с висок размножителен индекс, нисък брой формирани листни розетки и потиснат растеж на височина. Изненадващо, при тези варианти също така има и завишено съотношение FW/DW.

- При *P. halleri*, количественото съдържание на феноли и флавоноиди, както и морфометричните белези се влияят в по-ниска степен от въздействието на растежните регулатори (според получените от нас стойности в рамките на грешката на измерването). Количествата на синтезираните феноли и флавоноиди в по-голяма степен корелират с отношението FW/DW, като за разлика от *P. slaviankae*, при *P. halleri* завишеното съдържание на съединенията с фенолна структура корелира със завишаване на стойностите на DW.

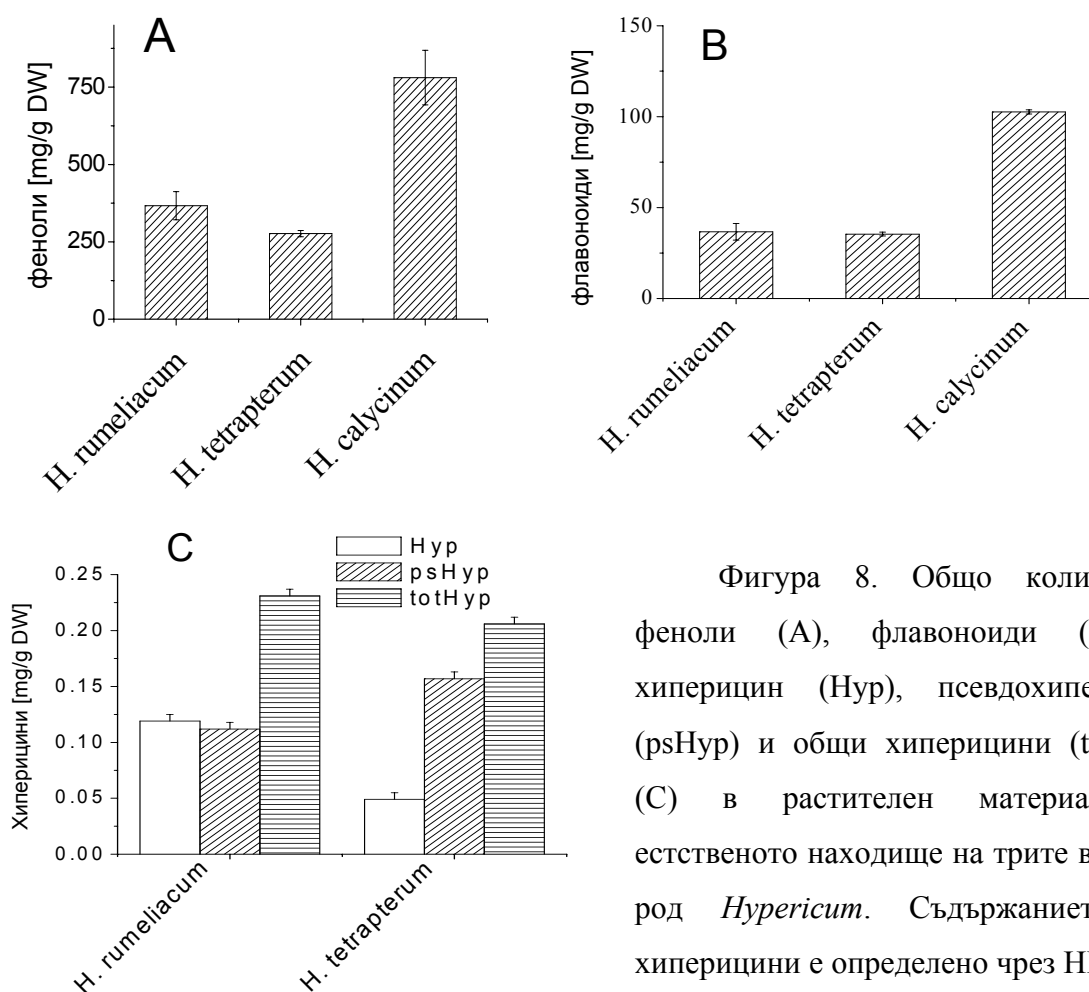
Високите стойности на съотношението chl a/b при някои от разглежданите от нас варианти хранителни среди говорят ясно за по-добрата приспособимост на растението към *in vitro* условията на хранителната среда. Би могло да се предположи, че при такива условия логично съществуват и предпоставки за по-ефективното протичане на фотосинтезата и набавяне на въглерод, в допълнение към екзогенно прибавената в средата захароза (Danova *et al.* 2009a).

Без провеждането и на допълнителни изследвания върху реалната ефективност на фотосинтезата *in vitro* обаче, получената от нас положителна зависимост между количественото съдържание на вторичните метаболити и съотношението chl a/b при някои от вариантите хранителни среди, на този етап би могла единствено хипотетично да се разглежда като признак на по-добрата приспособимост на растенията и наличието на оптималните физиологични

условия, позволяващи по-ефективното протичане на вторичния метаболизъм в култура.

3. Количествено определяне на феноли/флавоноиди и хиперицин/псевдохиперицин в надземни части от *H. rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum* от находището.

Количествата на вторичните метаболити в пробите от диворастящите *H. rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum* са представени на Фигура 8- А, В, С.



Фигура 8. Общо количество феноли (А), флавоноиди (В) и хиперицин (Нур), псевдохиперицин (psНур) и общи хиперицини (totНур) (С) в растителен материал от естественото находище на трите вида от род *Hypericum*. Съдържанието на хиперицини е определено чрез HPLC

Установено е, че докато при диворастящите *H. tetrapterum* и *H. rumeliacum*, количествата на общите фенолни и флавоноидни съединения са съизмерими, то при хиперицин непродуциращия *H. calycinum*, техните стойности са значително по-високи. Прави впечатление високото съотношение (1.06) на

хиперицин/псевдохиперицин, както и цялостно по-високото количество на хиперицина (0.119mg/gDW) при пробите от находището на *H. rumeliacum* в сравнение с *H. tetrapterum* (съответно $\text{Hyp}/\text{psHyp} = 0.31$ $\text{Hyp} = 0.049\text{mg/gDW}$).

В резултат на проведеното изследване се потвърждават теориите и на други автори за високия биосинтетичен капацитет на видовете от секция *Drosocarpium* (към която принадлежи *H. rumeliacum*) по отношение на хиперицин и псевдохиперицин, поради което той беше избран като подходящ обект за по-нататъчна биотехнологична разработка и експерименти по криопрезервация с цел консервация на високопродуктивни линии *ин vitro*.

4. Влияние на витаминния състав върху *H. rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum* *ин vitro*

Изследвани са натрупването на биомаса, морфометричните характеристики, количеството на пластидните пигменти, малондиалдехид и водороден пероксид и количественото съдържание на феноли/флавоноиди и хиперицин/псевдохиперицин в два варианта хранителни среди с модифициране на витаминния състав. За състав на макро- и микроелементите беше използвана основната формула по Murashige и Skoog. Съставът на среда RM е базиран на витамини по Gamborg, а съставът на среда MS е базиран на витаминната формула на Murashige и Skoog хранителна среда.

Влияние на витаминния състав върху *ин vitro* мултипликацията – както се вижда от Таблица 4, растенията отглеждани върху хранителна среда с витаминен състав по Gamborg (вариант RM), се характеризират с по-висока дължина на стъблата, в сравнение с тези, отглеждани в среда със състав на витамините по Murashige и Skoog (вариант MS). Интересно е да се отбележи, че броят на листните двойки на единица дължина на стъблото (индекс на компактност – IC, където $IC = \text{среден брой двойки листа} / \text{средна дължина на стъблото [cm]}$), при хранителна среда вариант MS е винаги по-висок отколкото при среда RM, подсказвайки за тенденция към преобладаване на стъблената маса при хранителната среда с по-интензивното натрупване на биомаса (вариант RM -

витамины по Gamborg), докато при средата с добавени витамини по Murashige и Skoog - по-висока листна плътност и преобладаване на листната тъкан в общата екстракционна биомаса.

Таблица 4. Морфометрични характеристики на трите вида от род *Hypericum* след 45 дни в двата варианта хранителни среди.

Растителен вид/хранителна среда	съотношение FW/DW	Дължина на стъблото [cm]	Брой формиращи аксиларни разклонения на експлант	Брой формиращи листни двойки на стъбло	Индекс на компактност (IC)
<i>H. rumeliacum</i> RM	4,8 (± 0.16)	2.04 (± 0.21)	3.29 (± 0.3)	3.75 (± 0.17)	1.84
<i>H. rumeliacum</i> MS	5.02 (± 0.2)	1.7 (± 0.18)	2.35 (± 0.18)	3.79 (± 0.23)	2.24
<i>H. tetrapterum</i> RM	4.71 (± 0.15)	5.03 (± 0.3)	2.52 (± 0.15)	5.47 (± 0.21)	1.09
<i>H. tetrapterum</i> MS	4.97 (± 0.12)	4.39 (± 0.3)	2.53 (± 0.23)	5.17 (± 0.21)	1.18
<i>H. calycinum</i> RM	4.75 (± 0.17)	1.42 (± 0.19)	2 (± 0.07)	3.03 (± 0.23)	2.13
<i>H. calycinum</i> MS	4.73 (± 0.13)	1.41 (± 0.2)	2.05 (± 0.14)	3.51 (± 0.25)	2.49

Цялостните наблюдения върху описаните по-горе параметри, показват, че добавянето на витамини по Gamborg стимулира *in vitro* мултипликацията, от гледна точка на дължината и броя на формираните аксиларни разклонения.

Растенията, отглеждани в среда със състав на витамините по Murashige и Skoog, обаче, са по-компактни и при тях в цялостния добив на екстракционен растителния материал преобладава листната маса.

Морфометрични различия, обусловени от модифицирането на витаминния състав - на Таблица 5 са представени експерименталните данни за броя на хиперициновите жлези на лист (HGN), средната листна площ в [mm²] - (LA) и гъстотата на разпределение на хиперициновите жлези (HGD), изразена като брой на жлезите на mm² при приосновни, средни и апикални листа на *H. rumeliacum* и

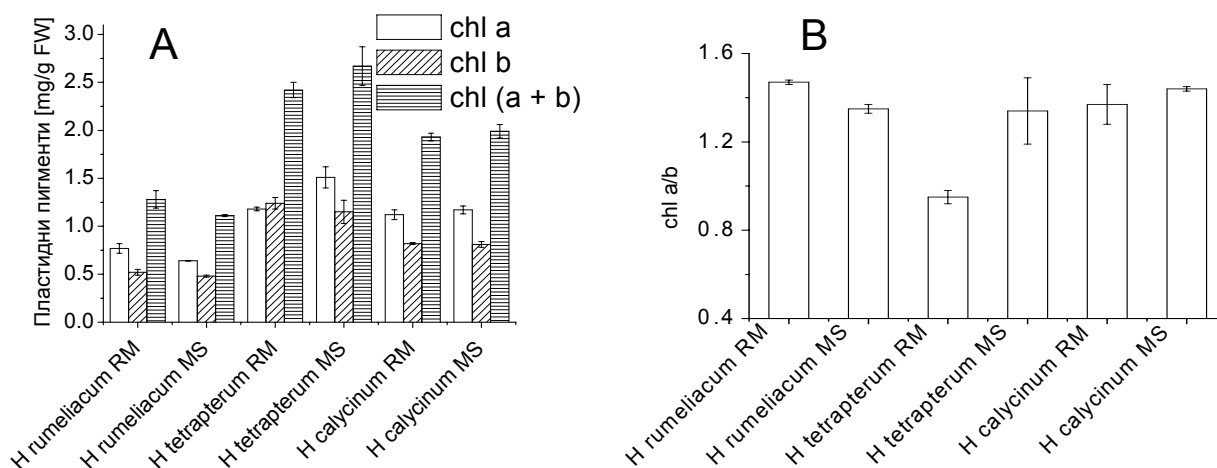
H. tetrapterum. При сравнението на HGN ясно се вижда, че съществува изразена разлика между листата, заемащи различна позиция върху стъблото при дадена линия *Hypericum* *ин vitro* (Таблица 5). Листата, разположени в приосновните сегменти, са винаги с по-нисък абсолютен брой жлези, в сравнение с пробите от останалите два типа сегменти.

Таблица 5. Влияние на витаминния състав върху броя на хиперициновите жлези на лист (HGN), листната площ (LA) и гъстотата на разпределение на хиперициновите жлези (HGD) при *ин vitro* култивирани *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum*.

Вид/ Хранителна среда	Приосновни листа			Листа от средна част на стъблото			Върхни листа		
	HGN	LA	HGD	HGN	LA	HGD	HGN	LA	HGD
		[mm ²]			[mm ²]			[mm ²]	
<i>H. rumeliacum</i> RM	7.67 (±0.52)	1.48 (±0.21)	7.84 (±0.72)	16.19 (±0.65)	4.45 (±0.41)	5.56 (±0.5)	12.02 (±0.72)	2.26 (±0.29)	7.28 (±0.62)
<i>H. rumeliacum</i> MS	6.35 (±0.47)	1.49 (±0.2)	5.39 (±0.32)	13.18 (±0.56)	4.03 (±0.39)	4.86 (±0.28)	12.12 (±0.57)	2.43 (±0.18)	5.2 (±0.3)
<i>H. tetrapterum</i> RM	3.34 (±0.7)	4.46 (±0.8)	1.14 (±0.23)	12.66 (±1.5)	16.18 (±1.97)	0.88 (±0.06)	13.75 (±1.16)	7.37 (±0.8)	2.5 (±0.26)
<i>H. tetrapterum</i> MS	4.93 (±0.9)	6.26 (±0.9)	0.98 (±0.9)	14.63 (±1.45)	23.15 (±2.27)	0.72 (±0.05)	13.4 (±1.4)	8.1 (±0.8)	1.91 (±0.17)

Получените данни за броя на хиперицинови жлези, също така бяха анализирани от гледна точка на гъстота на разпределение на хиперициновите жлези на единица листна площ (HGD) при всеки от типовете листна проба. Както се вижда от таблицата, при анализиране на този показател от гледна точка на броя на жлезите на [mm²], се вижда, че стойностите му са винаги по-високи за среда вариант RM, в сравнение с тези при MS за съответния листен сегмент от една страна, и по-високи при *H. rumeliacum* в сравнение с *H. tetrapterum* от друга.

Количество на пластидните пигменти - от фигурите се вижда, че общото количество пигменти при *H. tetrapterum* и *H. calycinum* е завишено спрямо това при *H. rumeliacum* (Фигура 9 -A). Най-високото количество пигменти при сравнението на трите вида се наблюдава при *H. tetrapterum*. Също така, прави впечатление, че при *H. tetrapterum* и *H. calycinum* по-високо общо количество хлорофилни пигменти се наблюдава при среда MS, като това съотношение е по-добре изявено при първия вид. Това явление корелира и би могло да се обясни с по-високите стойности на IC (преобладаването на листната маса), наблюдавано във втората среда, в сравнение с първата, за всеки от изследваните видове. При *H. rumeliacum* обаче, разликите в количествата на фотосинтезиращите пигменти между двете среди не са статистически значими. Прави впечатление, че въпреки различията при абсолютните стойности на количествата на фотосинтезиращите пигменти, анализираниите съотношения на chl a/b не показват големи различия (с изключение на по-силно занижената стойност за *H. tetrapterum* в среда RM).



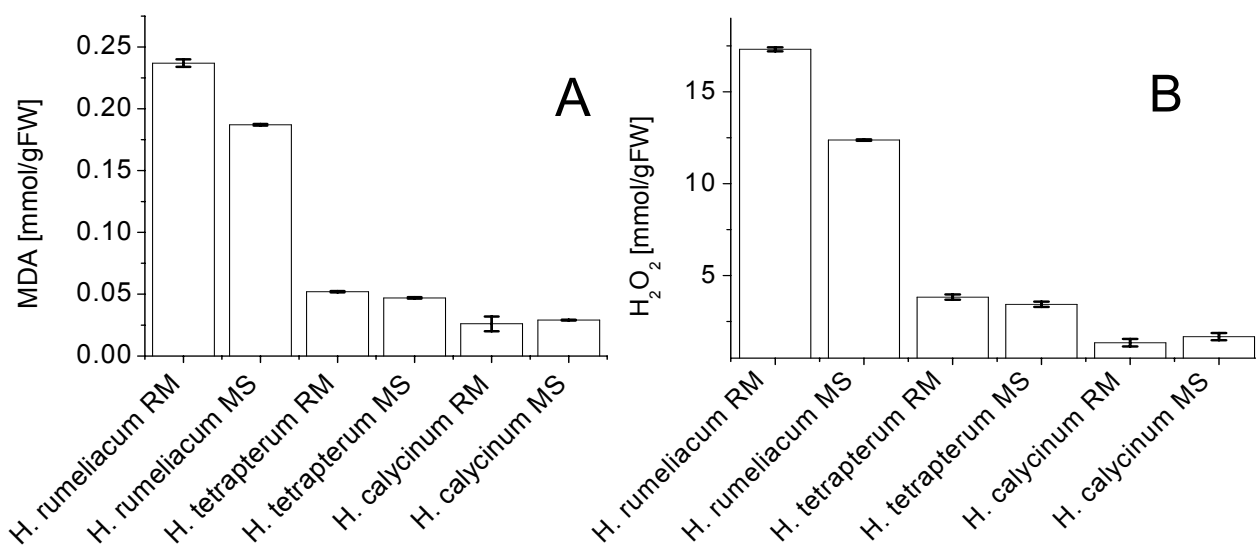
Фигура 9. Влияние на състава на хранителната среда върху съдържанието на хлорофилни пигменти - chl a, chl b и chl (a + b) (A) и съотношение на chl a/b (B) при трите изследвани вида от род *Hypericum*.

Трябва да се отбелжи, че и при *H. tetrapterum* и хиперицин непродуциращия *H. calycinum* количеството общи хлорофилни и съотношението chl a/b (Фигура 9- B) са занижени при среда RM в сравнение със среда MS, което е в корелация с

установените занижени количества на феноли и флавоноиди при тези варианти (Фигура 11-А, В).

Това наблюдение е в съгласие и с наблюдаваните от нас зависимости при биосинтеза на феноли и флавоноиди и chl a/b при видовете от род *Pulsatilla*. Интересно е да се отбележи, че при *H. rumeliacum*, отношението е противоположно спрямо другите два вида – по-високото съотношение на chl a/b се наблюдава в среда RM – в корелация със силно завишените количества на хиперицин и псевдохиперицин при този вариант, както е дискутирано по-долу.

Малондиалдехид и водороден пероксид - получените от нас експериментални резултати по отношение на количеството на малондиалдехид и водороден пероксид за трите вида *ин витро* са представени на Фигура 10. Както се вижда, стойностите на тези два показателя са значително завишени при *H. rumeliacum*, в сравнение с другите два вида.

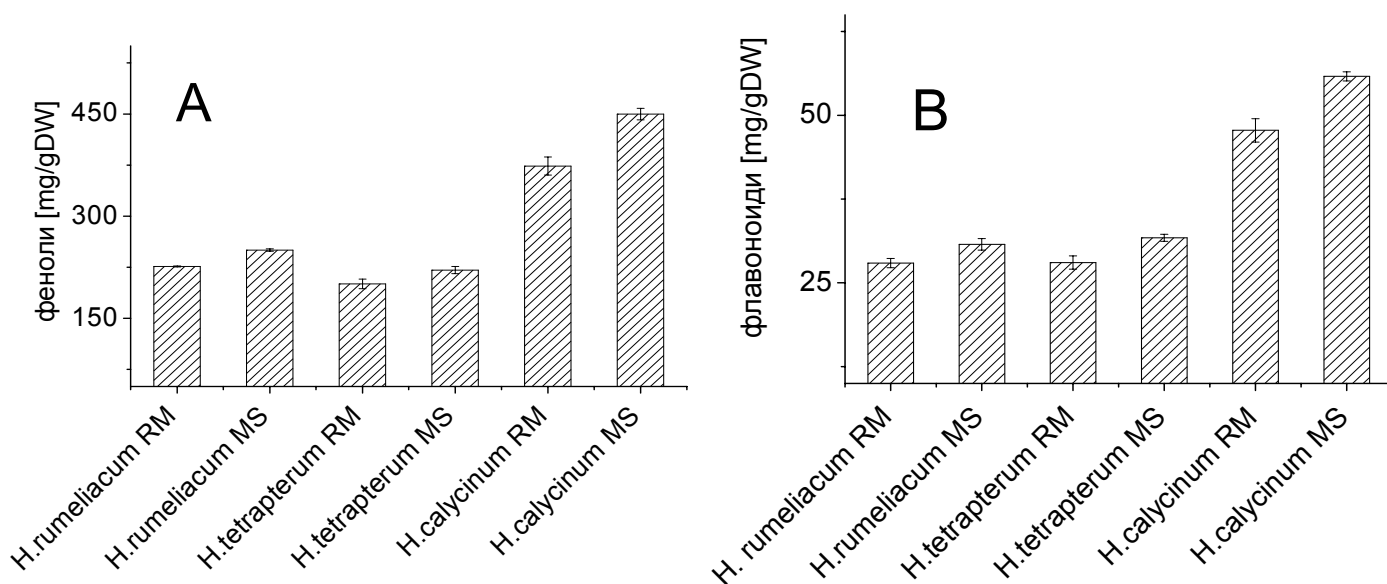


Фигура 10. Влияние на витаминния състав върху съдържанието на малондиалдехид (А) и водороден пероксид (В) при *H. rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum* в *ин витро* условия.

Нещо повече, при този вид разликата между двете среди е значително по-голяма отколкото при другите два вида. Прави впечатление, че при *H. rumeliacum*

и *H. tetrapterum*, завишените нива на малондиалдехид и водороден пероксид корелират с по-интензивното формиране на биомаса.

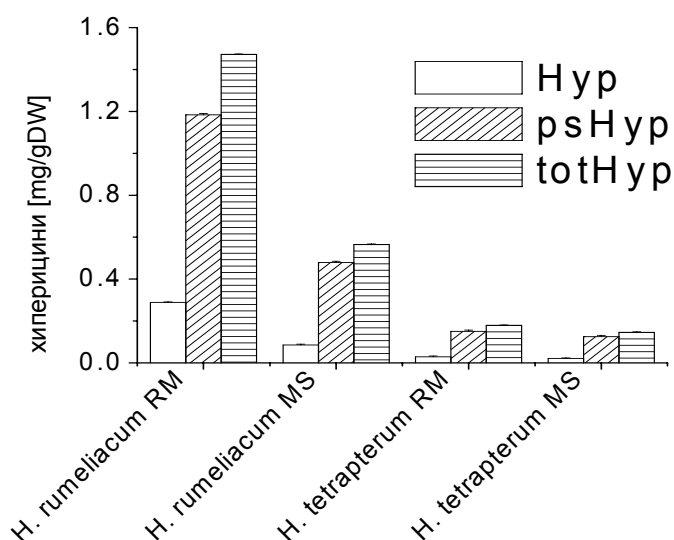
Количествено съдържание на феноли и флавоноиди - сравнението на общото количество фенолни и флавоноидни съединения *ин vitro* за двата варианта хранителни среди показва, че и при трите вида *Hypericum*, въпреки, че вариант RM (витамини по Gamborg) стимулира *ин vitro* мултипликацията, това е свързано с понижение на общото количество изследвани метаболити (Фигура 11). Би могло да се предположи, че завишените количества на феноли и флавоноиди в среда MS се дължат на завишението на листната маса в общото количество екстакционна биомаса при този вариант, спрямо завишената стъблената маса при вариант RM. Това предположение би могло да се направи въз основа на стойностите на IC за двата варианта хранителни среди (Таблица 4), които и при трите изследвани вида *Hypericum* показват формирането на по-сбити стъбла при добавка на витамини по Murashige и Skoog.



Фигура 11. Влияние на състава на хранителната среда върху съдържанието на общи феноли (A) и флавоноиди (B) при растения *H. rumeliacum*, *H. tetrapterum* и *H. calycinum*, развиващи се *ин vitro*.

Количествено съдържание на хиперицин и псевдохиперицин

Беше установено, че повлияването на количествата на Нур и psНур от двата варианта на добавени витамини (Фигура 12), е в обратна зависимост в сравнение с получените резултати за феноли и флавоноиди (Фигура 11) - при среда RM (витамини по Gamborg), количествата на Нур и psНур, както и съотношението Нур/psНур са завишени и при двата вида в сравнение със средата MS (витамини по Murashige и Skoog).



Фигура 12. Влияние на витаминния състав на хранителната среда (MS; RM) върху количеството на хиперицин, псевдохиперицин и общи хиперицини в култура от надземните части на *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum*. Определянето е извършено чрез HPLC.

Връзка между количественото съдържание на хиперицин/псевдохиперицин и гъстотата на разпределение на хиперициновите жлези

Експерименталните резултати показаха, че гъстотата на хиперициновите жлези, изразена като брой жлези на единица листна площ ($HGD = HGN/mm^2$), за разлика от абсолютния брой на жлезите на лист е тясно свързана с измерените количества на Нур/psНур при сравняване на надземните части на *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum*, култивирани в двата варианта на хранителни среди, а така също и при самото сравняване между двата различни вида (Таблица 5 и Фигура 12). Ето защо HGD може ефективно да се използва като бърз диагностичен маркер при предварителните етапи на оптимизиране на различните параметри на култивиране при селекцията на високопродуктивни линии по отношение на хиперицина, при контролирани условия *ин vitro*. Също така, важно е да се

събират листни проби от определени сегменти от стъблото (приосновен, междинен и апикален) за да се отчитат и анализират резултатите от листа при същата фаза на онтогенезата.

Наблюдаваните тенденции са валидни и при трите изследвани вида, което говори по-скоро за родова, а не за видова специфичност на повлияването на растежа *ин vitro* при модифицирането на витаминния състав при изследваните видове от род *Hypericum*. Ето защо, получените резултати са с практическо значение при анализирането на поведението на представителите от род *Hypericum* *ин vitro* и за оптимизиране на продукцията на вторични метаболити и при други видове от рода.

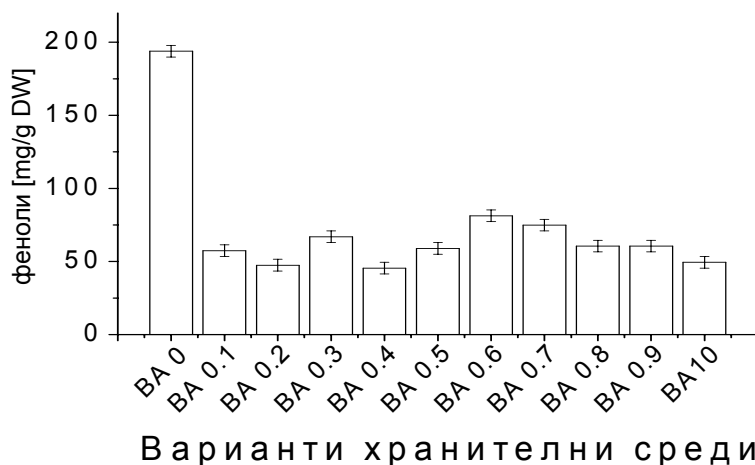
Интересното при нашите резултати от сравняването на хиперицин “високопродуктивен”, хиперицин “нископродуктивен” и хиперицин непродуциращ вид е, че съдържанието на MDA и H_2O_2 силно корелират с продуцираните количества на хиперицин/псевдохиперицин, докато количествата на измерените феноли и флавоноиди очевидно не повлияват тези показатели *ин vitro*.

5. Влияние на растежните регулатори върху *ин vitro* регенерацията и количеството на вторични метаболити при *H. rumeliacum*

Беше установено, че NAA (тестувана в концентрации от 0,1 до 1mg/l) оказва инхибиращо действие върху растежа на *H. rumeliacum* *ин vitro*, като дори и в ниските концентрации (0,1 – 0,3 mg/l) се наблюдаваха само единични случаи от заложените експланти, при които се индуцират аксиларни разклонения, като винаги в основата на заложените експланти се генерира и калус. Добавянето на бензиладенин в хранителната среда (тестуван в концентрации от 0,1 до 1mg/l) води до силно повишаване на мултипликационния капацитет *ин vitro* - изразено в генериране на голям брой аксиларни разклонения (до над 35 на експлант). Наблюдаваният ефект също така е съчетан и със силно изразеното натрупване на вода в растителната тъкан и генериране на калус в основата на заложените експланти. Нещо повече, дори и слабото повишаването на концентрацията на BA

над 0,2 mg/l води до засилване на калусогенеза в основата на заложените експланتي.

Беше установено, че при *H. ruteliacum* *ин vitro*, както ниските, така и високите концентрации на ВА в хранителната среда намаляват повече от двукратно съдържанието на фенолни съединения в надземните части, култивирани в съответните варианти хранителни среди (Фигура 13).



Фигура 13. Влияние на ВА върху количеството на фенолни съединения при *H. ruteliacum* в условия *ин vitro*. Индексът 0 – 1 изразява концентрацията на ВА в хранителната среда в mg/l.

6. Изучаване на морфогенния капацитет *ин vitro* на експланتي от *H. ruteliacum* под въздействие на растежни регулатори.

Разгледани са общо 16 варианта експлант/среда. В четири варианта хранителни среди: I (1mg/l 2,4-D), II (1mg/l NAA), III (1mg/l BA) и IV (1 mg/l BA + 0.1mg/l NAA) са тествани 4 типа експланتي 1- (листна петура), 2 (междувъзлие), 3 (стъблен възел) и 4 (коренов експлант).

Морфогенният отговор на експлантите беше отчетен след 45 и 60 дни от тяхното залагане. Нашите наблюдения показаха, че ауксинът, добавен в хранителната среда (както 2,4-D, така и NAA – среди I и II) води до формирането на специфични червеникави глобуларни структури на всички видове експланتي с изключение на кореновите резници, при които по-често се проявява некроза, и много рядко единствено калус при средите с добавен ауксин, и на междувъзлията, при които червените глобуларни структури се наблюдават единствено при хранителната среда с NAA (II).

По-нататъшните наблюдения на експлантите върху среда II показаха пролиферация на калус по отрязаната повърхност (при междувъзлията), или по протежение на целия експлант (коренови резници) и много рядко диференциация на надземни части при стъблените възли. Самостоятелно (III) или в комбинация с NAA (IV), BA води до формирането на калус с морфогенен потенциал при всичките четири типа експлантите, както и до формирането на фини коренови власинки при междувъзловите и възлови експлантите. Хиперициновите жлези бяха ясно видими по краищата на диференциращите се листа и дори в самата калусна тъкан. Както в III, така и в IV вариант хранителни среди се наблюдава интензивна пролиферация на над 10 стъбла от експлант и от четирите типа експлантите, като в среда IV (1mg/l BA + 0.1mg/l NAA) е установен като цяло по-интензивен калусогенез.

Визуалното наблюдение на регенерираните структури показва наличие както на соматичен ембриогенез, така и на индиректен органогенез чрез калус. Анализът на хистологични прерези, извършен като част от това изследване, потвърди наличието както на ембриониди, така и на меристемоиди при тези варианти хранителни среди. Нашите наблюдения показаха, че при варианта хранителна среда с BA, регенерацията се осъществява предимно чрез меристемоиди, и по рядко се наблюдава формирането на соматични ембриа, докато при комбинацията на BA и NAA се срещат както ембриониди, така и меристемоиди.

След поставяне на формираните структури в основна MS хранителна среда, без добавянето на растежни регулатори, в рамките на един пасаж от 45 дни, надземни части бяха регенерирани от варианти III₁₋₄ и IV₁₋₄.

Изборът на подход за *in vitro* мултипликация на *H. rumeliacum* беше съобразен с целта на настоящата дисертация - да се селектират условия за оптималното мултиплициране на надземни части, за добива на вторични метаболити. Ето защо, нашите наблюдения за цялостно по-интензивен калусо- и ембриогенез при комбинацията ауксин + цитокинин доведоха до заключението, че добавянето единствено на цитокинин е по-подходящо при *H. rumeliacum*.

7. Двустъпално култивиране на *Hypericum rumeliacum* – подход за натрупване на биомаса и запазване на синтеза на феноли и флавоноиди *in vitro*

Експериментът беше проведен с цел да се установи несложна и ефективна регенерационна система за *in vitro* мултипликацията на надземни части на *H. rumeliacum*. От надземни части на растението, поддържани в основна MS хранителна среда, бяха изолирани три-нодални стъблени експлантите. Експлантите бяха поддържани в среда с 0,2mg/l BA (MSBA₂) среда за 12 седмици, след което бяха прехвърлени за още 12 седмици в среда, без растежни регулатори (MS/MSBA₂). Контролните растения бяха култивирани върху среда без растежни регулатори (MS) за същия период от време.

Морфометрични характеристики на надземните части при двустъпалното култивиране

Този подход доведе до значителното нарастване на формираната биомаса за кратък период от време. Засиленото формиране на латерални пъпки в среда MSBA₂ доведе до формирането на над 35 аксиларни разклонения за 12 седмици при всеки от първоначално заложените експлантите. На Таблица 6 са представени някои морфометрични характеристики на формираните надземни части при подхода за двустъпално култивиране. Както се вижда от таблицата, добавянето на BA води до значително увеличаване на свежото тегло и броя на формираните аксиларни разклонения, както и тяхната дължина. От друга страна, както беше дискутирано и по-горе, добавянето на цитокинин, дори в ниска концентрация индуцира формирането на калус в основата на експлантите.

Завишението на FW/DW, също така показва по-високото водно съдържание в растителната тъкан, в среда MSBA₂. Въпреки, че добавянето на BA доведе до удължаване на междувъзлията, като формираните разклонения в среда MSBA₂ бяха около 2.3 пъти по-удължени в сравнение с тези при MS, броят на формираните двойки листа на стъбло не се различаваше значително при двата

варианта среди. Количествено тази зависимост се изразява с отчитания индекс на компактност (IC), чиито физически смисъл беше обяснен по-горе.

Таблица 6: Морфометрични характеристики на култура от надземни части на *H. rumeliacum* в среда без PP (MS) и среда с 0.2mg/l BA (MSBA₂).

Хранителна среда	FW/DW	Дължина на стъблата [cm]	Брой аксиларни разклонения	Брой листни двойки на стъбло	Индекс на компактност (IC)
MS	4,96 (±0,32)	1,41 (± 0,12)	3.0 (± 0.47)	4.3 (± 0,45)	3.04
MSBA ₂	8,71 (±1,06)	3.24 (± 0.42)	> 35 (±3,4)	4.57 (± 0,24)	1.41

Това наблюдение води до извода, че MS култивираните надземни части съдържат повече листна биомаса на единица тегло, докато при MSBA₂ преобладава стъблената тъкан. След прехвърлянето на три-нодални стъблени експланти от MSBA₂ в MS/MSBA₂ хранителна среда (среда без цитокинин), се елиминира и формирането на калус показвайки, че неблагоприятният ефект е преходен и не-кумулятивен след изключването на растежния регулатор от хранителната среда.

Количествено съдържание на феноли и флавоноиди при двустъпалното култивиране

Докато измереното количество на флавоноидите след 12 седмици култивиране в MS хранителна среда, беше 35.46mg/g DW, то култивирането в MSBA₂ води до намаляване на техните количества до 14.65mg/g DW. След прехвърляне върху MS/MSBA₂ (елиминиране на BA от хранителната среда) се наблюдава последващо завишаване на измереното количество на флавоноиди до 21.93 mg/g DW. Количествените резултати за общо фенолно съдържание бяха аналогични – от 313.39 mg/g DW в MS хранителна среда, през 135.1 mg/g DW в среда MSBA₂ до повишение при MS/MSBA₂ - 262.43 mg/g DW.

Въз основа на проведените морфометрични измервания, пониженият биосинтетичен капацитет на *H. rumeliacum* в среда с добавен ВА, би могъл да се отдаде от една страна на твърде интензивната пролиферация на надземни части и формиране на калус или на преобладаващата стъблена тъкан в среда MSBA₂ в сравнение със средата без добавен растежен регулатор – MS.

Разработеният и предложен подход за двустъпалното култивиране на *H. rumeliacum* дава предимството на технологичната опростеност на еднократния пасаж на надземни части от растението през среда с ниска концентрация на бензиладенин, последвано от елиминиране на растежния регулатор.

7. Криопрезервация на стъблени меристемни връхчета на *ин vitro* култивиран *H. rumeliacum*.

В настоящата дисертация са описани първите експерименти по криопрезервация на балканския ендемичен *H. rumeliacum*. На експерименти по криопрезервация бяха подложени стъблени меристемни връхчета от *ин vitro* култивиран *H. rumeliacum*. Бяха проведени експерименти по криопрезервация чрез витрификация и чрез програмирано бавно охлаждане. Прекултивирането беше извършено в течна MS хранителна среда с витамини по Gamborg + 0.5mg/l ВА (RMB_{0,5}), с добавена АВА или манитол, за съответния период от време, както е указано в Таблица 7.

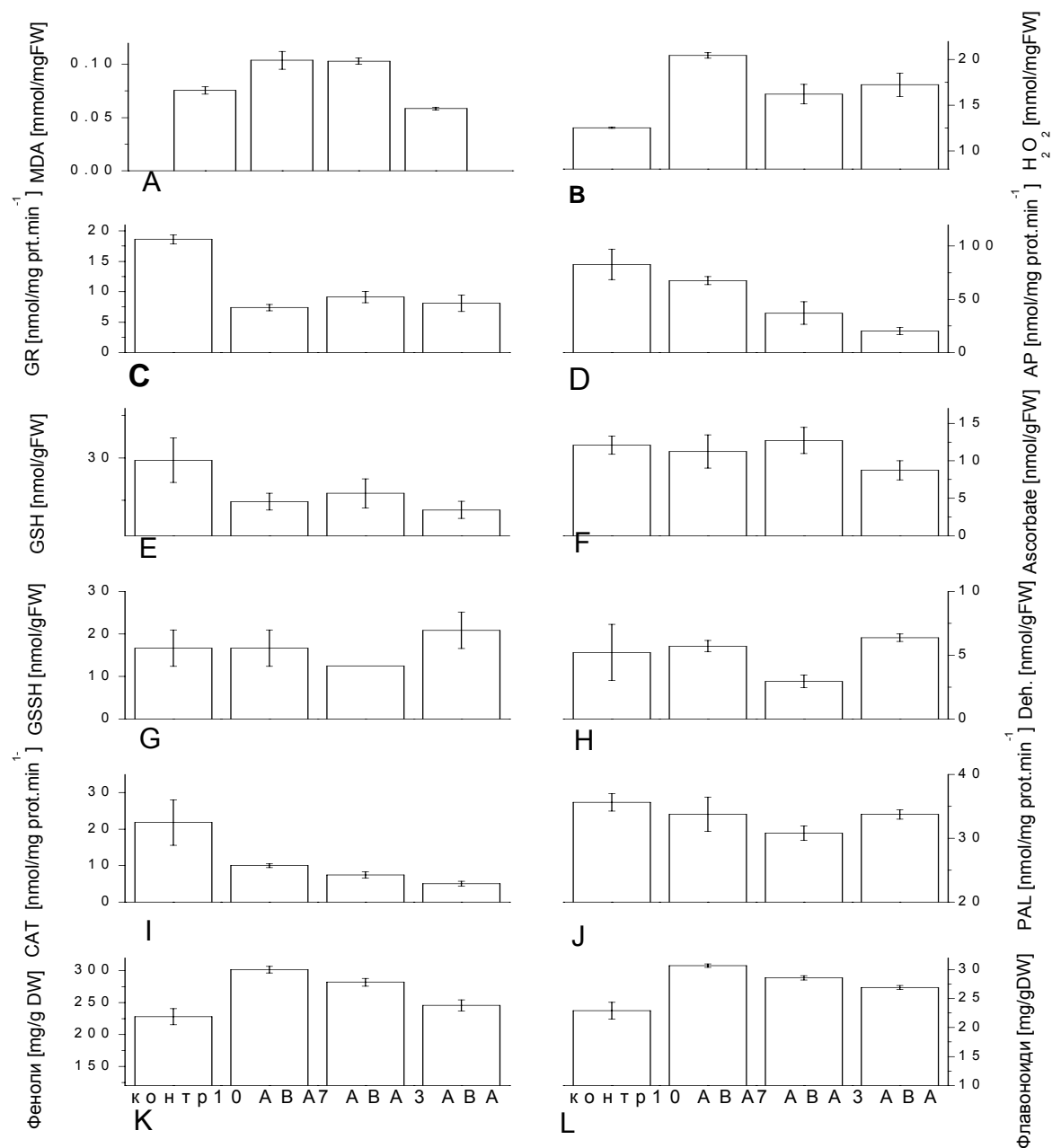
Както се вижда, при проведените от нас първоначални експерименти за прилагане на протокола за криопрезервация, успешно установен след дългогодишни проучвания и прилагане върху *H. perforatum*, процентът на регенерация при *H. rumeliacum* е все още нисък (Таблица 7).

Таблица 7. Влияние на прекултивирането, криопротекцията и метода на замразяване при криопрезервация върху процента оцелели растения *H. rumeliacum*. *(брой регенерирали растения спрямо първоначално заложените меристемни връхчета).

Условия на прекултивиране	Криопротектор	Метод на замразяване	Процент оцелели растения
0.076 μ M ABA, 10 дни	PVS3	витрификация	1.3% (2/154) *
0.076 μ M ABA, 7 дни	PVS3	витрификация	2.2 % (1/45) *
0.076 μ M ABA, 3 дни	PVS3	витрификация	1.4% (1/70) *
0.3 M манитол, 7 дни	20% захароза (w/v), 10% глицерол (w/v) и 10% DMSO (w/v)	контролирано бавно замразяване	0% (0/51) *
0.076 μ M ABA, 10 дни	20% захароза (w/v), 10% глицерол (w/v) и 10% DMSO (w/v)	контролирано бавно замразяване	2% (1/50) *

7.1. Характеризиране на регенерирани растения от *H. rumeliacum* след съхранение в течен азот при температура -196°C.

Извършеният в настоящата разработка анализ е проведен върху *ин vitro* култивиран *H. rumeliacum*, регенериран след обработката на стъблени меристемни връхчета на растението по протокола за криопрезервация чрез бавно замразяване, съхранение в течен азот (при -196°C), размразяване и последваща регенерация и мултиплициране на култура от надземни части на регенерираните растения, приблизително една година и половина след размразяване. *Аскорбат пероксидаза: AP (EC 1.11.1.11)* - аскорбат пероксидазната активност е най-висока при контролните, незамразявани и при 10ABA- прекултивираните растения. При 7 ABA-прекултивираните регенеранти тази активност е по-ниска, а най-ниска е при 3ABA (Фигура 14-D). Корелация между ниски стойности на водородният пероксид и завишената аскорбат пероксидазна активност се забелязва единствено при контролните растения. *Глутатион редуктаза: GR (EC 1.6.4.2)* - въпреки, че активността на глутатион редуктазата е все още цялостно занижена при регенерираните растения в сравнение с контролите, най-високи стойности за активността на ензима се отчитат при контролните и 7ABA прекултивираните растения (Фигура 14-C).



Групи растения

Фигура 14. Характеристика на регенерираните след криопрезервация растения и техните незамразявани контроли: количество на малондиалдехида (A), водородният пероксид (B), глутатионредуктазната активност (C), аскорбат пероксидазната активност (D), количеството редуциран глутатион (E), количеството на аскорбата (F), количеството на окислен глутатион (G), дехидроаскорбат (H), каталазната активност (I), активността на PAL (J) и количествата на феноли (K) и флавоноиди (L). Трите групи замразявани растения са прекултивирани в 0.076μM ABA за 3, 7 и 10 дни (означени съответно като 3, 7 и 10 ABA).

Интересно е да се отбележи и това, че повишената глутатионредуктазна активност при вариант 7ABA също така корелира и с понижено количество на водородния пероксид (като маркер на оксидативният стрес) (Фигура 14-B), което също се отчита при контролни и 7ABA-прекултивирани растения. Това би могло да се приеме като индикация за ролята на глутатион редуктазата в ензимната антиоксидантна защита на *in vitro* култивирания *H. rumeliacum*. Нещо повече: както се вижда от (Фигура 14-I) *каталазната активност (EC1.11.1.6)* при регенерираните растения е принципно значително занижена спрямо контролните растения което е индикация за слабото възстановяване на активността на този антиоксидантен ензим вследствие на крио-стреса.

Интересно е да се отбележи, че аналогично на занижената аскорбатпероксидазна активност, каталазната активност също така е най-силно занижена при вариант 3ABA. Освен отчетените най-високи стойности на глутатион-редуктазната активност и отношение Asc/DehAsc, при контролните и 7ABA претретирани регенерантни линии, също така при тези две линии се наблюдават и най-високите стойности на отношението GSH/GSSH (Фигура 14-C и Таблица 8). Установените занижени нива на окислен глутатион (GSSH), както и завишените нива на редуцирания глутатион (GSH), който е продукт на активността на ензима, са в корелция с отчетената завишена активност на глутатион редуктазата и занижените нива на водороден пероксид при контролните и 7ABA претретирани растения.

Най-ниските стойности на глутатион-редуктазната активност и отношението GSH/GSSH се наблюдават съответно при варианти 3 ABA и 10ABA.

В допълнение, най-ниските стойности на отношението Asc/DehAsc се наблюдава при варианти 10ABA и 3ABA (Таблица 8). Както вече беше отбелязано при вариант 3ABA също така се отчитат най-ниска каталазна и аскорбат-пероксидазна, както и занижена глутатион-редуктазна активности. Тези резултати показват, че вариантите 3 и 10 дни се отличават с по-слабо възстановяване на антиоксидантните ензимни системи в сравнение с незамразяваните контроли.

Количествата и съотношението на фотосинтезиращите пигменти, както и количеството на натрупване на свежо тегло и GSH/GSSH и Asc/Deh са представени на Таблица 8.

Прави впечатление, че аналогично на гореизброените показатели, съотношението chl a/b отново е най-високо при контролните и 7ABA прекултивирани растения. Интересно е, че подобно на значителното завишение на количеството на хиперицин/псевдохиперицин при вариант 7ABA над контролните количества, тази зависимост се наблюдава и при съотношението chl a/b.

Таблица 8. Характеристика на регенерираните след криопрезервация растения и техните незамразявани контроли: количество на пластидните пигменти, натрупване на свежа маса, съотношение на редуциран към окислен глутатион и аскорбат/дехидроаскорбат. Трите групи замразявани растения са прекултивирани в 0.076μM ABA за 3, 7 и 10 дни (означени съответно като 3, 7 и 10 ABA).

	Пластидни пигменти				FW/DW	GSH/GS SH	Asc/Deh
	Chl a [mg/ gDW]	Chl b [mg/ gDW]	Chl tot [mg/ gDW]	Chl a/b			
Контролни растения	1,14 (±0,1)	0,36 (±0,06)	1,5 (±0,07)	3,45 (±0,86)	6,04	1,75	2,314
10 ABA	1,03 (±0,05)	0,58 (±0,03)	1,61 (±0,09)	1,79 (±0,01)	6,44	0,875	1,967
7 ABA	1,72 (±0,2)	0,32 (±0,01)	2,04 (±0, 2)	5,26 (±0,57)	6,63	1,402	4,323
3 ABA	0,77 (±0,09)	0,29 (±0,04)	1,06 (±0,1)	2,71 (±0,08)	5,32	0,560	1,374

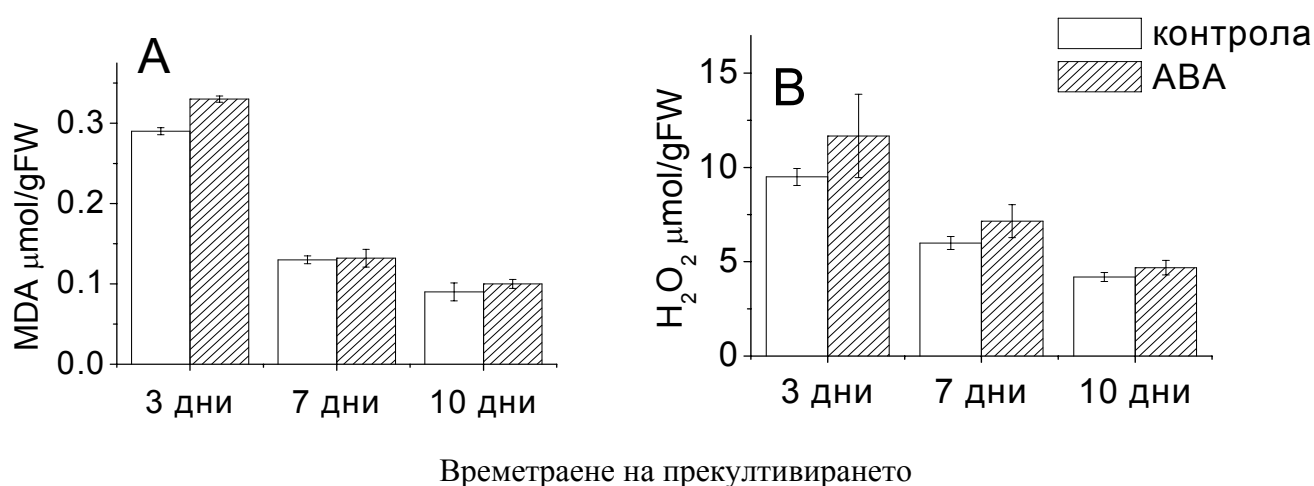
Ниският процент регенерирани растения при *H. rumeliacum*, след прилагането на условия на прекултивиране и замразяване, сходни с тези при по-

широко проученият *H. perforatum*, са индикация за наличието на генотипно-обусловени особености, водещи до по-слабия отговор при *H. rumeliacum*.

Това мотивира провеждането на изследванията за охарактеризиране на *H. rumeliacum* в етапите, предхождащи замразяването в течен азот, описани по-долу.

7.2. Експериментален модел за определяне на физиолого-биохимичния статус на *Hypericum rumeliacum* при етапа на прекултивиране – “механична контрола” на протокола за криопрезервация.

Експериментът възпроизвежда етапа на прекултивиране при протокола за криопрезервация на трите линии, регенерирани растения след съхранение в течен азот, чиито физиолого-биохимични характеристики са описани в *Точка 7.1.* по-горе. За целите на експеримента, стъблени апикални експлантати от *ин vitro* култивиран *H. rumeliacum*, бяха третирани в течна MS хранителна среда, с витамини по Gamborg, 100 mg/l мио-инозитол и 0,5 mg/l BA (RMB_{0.5}) с добавена 0.076μM ABA за 3, 7 и 10 дни. Контролните растения бяха култивирани също в течна RMB_{0.5}, но без добавена абсцисиева киселина. За всяка група от анализирани растения бяха култивирани по 50±5 експланта (Danova 2010).



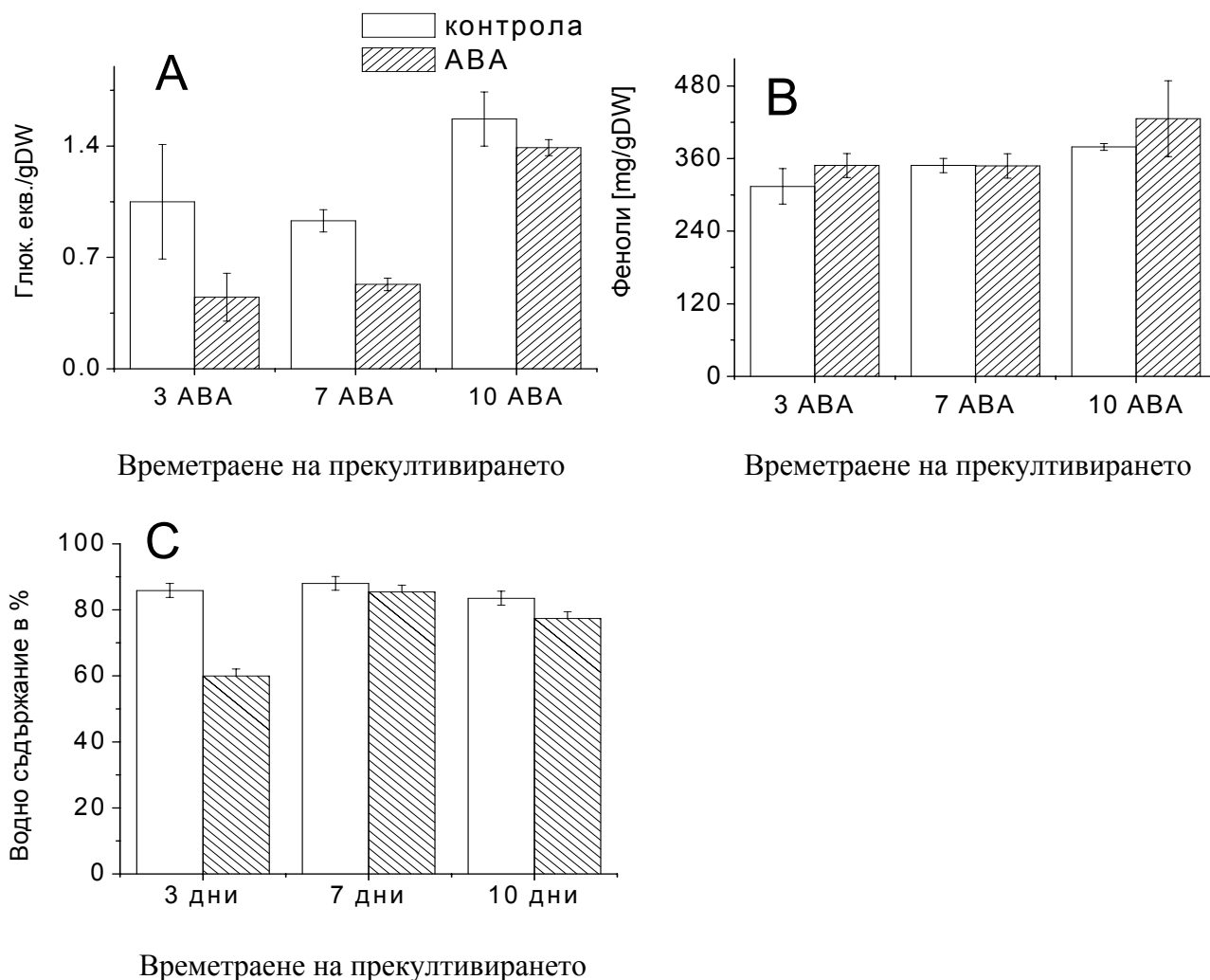
Фигура 15. Влияние на времетраенето на прекултивиране върху количеството на MDA (A) и H₂O₂ (B) върху стъблени върхни експлантати на *H. rumeliacum* в контролна течна RMB_{0.5} среда (без добавена ABA) и среда RMB_{0.5} с добавена 0.076μM ABA.

На сметите проби от контролни и претретиранни растения бяха определени нивото на MDA, H_2O_2 , общото количество на фенолите, разтворимите захари и водното съдържание в етапа на прекултивиране. Експерименталните резултати показват, че като цяло, нивата на MDA (Фигура 15-A) и H_2O_2 (Фигура 15-B) спадат във времето както при ABA-третираните, така и при контролните варианти в течната RMB_{0.5} хранителна среда. Това поведение е логично, тъй като при по-дългият период на прекултивиране, изолираните експланти постигат по-пълно възстановяване от стреса на механичното увреждане, което се получава при тяхната дисекция и изолиране от надземните части и прехвърлянето им в течната среда за прекултивиране. При проведените изследвания прави впечатление, че при някои от изследваните периоди (от 3, 7 и 10 дни) стойностите на MDA и H_2O_2 при ABA-третираните варианти са завишени в сравнение със съответните им контролни варианти (Фигура 15-A, B). Без извършването на други анализи, на този етап наблюдаваните от нас завишени нива на H_2O_2 и MDA при ABA третираните линии в сравнение със съответните им контроли биха могли да се обяснят с евентуален антагонизъм на ефектите на абсцисиевата киселина и BA, влизащ в състава на RMB_{0.5}. Експерименталните резултати от настоящото проучване показват, че като цяло натрупването на захари в анализиранияте проби преминава през обща lag-фаза преди нивата им да започнат да се покачват както в ABA-третитиране, така и в съответните им контролни растения. Интересно е, че нивата на общите разтворими захари при ABA-третираните растения са винаги по-ниски от нетретираните им контроли (Фигура 16-A).

По отношение на общото количество фенолни съединения, се наблюдава само тяхното слабо завишаване, както при ABA-третираните растения, така и при съответните им контроли, като различията им не са статистически значими (Фигура 16-B).

Резултатите от измерването на общото водно съдържание при етапа на прекултивиране (Фигура 16-C) показват инхибиране на натрупването на вода в тъканите при ABA-третираните проби в сравнение със съответните им контроли

само в началото на етапа на прекултивиране. Хидратацията на АВА-третираните растения се възстановява с увеличаването на времето на култивиране в течната среда.



Фигура 16. Влияние на времетраенето на прекултивирането върху общо количество на разтворимите захари (А), феноли (В) и водното съдържание (С) при АВА третирани и контролни стъблени върхни експланти от *H. rumeliacum* в течна RMB_{0.5} хранителна среда.

Получените резултати от проведения експеримент показаха, че механичният стрес, предизвикан от манипулациите по подготовката на експлантите за прекултивиране, постепенно намалява във времето, като при проба 3АВА нивата на малондиалдехид и водороден пероксид са все още значително завишени. Резултатите от проведените от нас изследвания върху растенията, регенерирани след съхранение при температура -196°C, в сравнение с

незамразяваните контроли, показват, че дори повече от година след размразяване и регенерация, възстановяването на антиоксидантните ензимни системи и цялостният физиолого-биохимичен статус на растенията корелират със степента на индуцирания от механичната обработка на експлантите ранев стрес преди самото замразяване в течен азот.

Ето защо, при разработката на протокол за криопрезервация при всеки конкретен растителен вид е от изключително значение отчитането, анализирането и интерпретирането на показателите, характеризиращи физиологичния статус на използваните експланти преди директното им замразяване в течен азот.

Заклучение

Цялостната биотехнологична разработка на даден растителен вид налага решаването на редица практически задачи и изисква прилагането на широк набор от методологични подходи. Като основни фактори, допринасящи за успешния и устойчив резултат на изследването биха могли да се посочат:

- Правилният и планиран подбор на растителния обект за работа;
- Установяването на зависимостите, свързани с биосинтеза на целевите вторични метаболити *ин vitro*;
- Разработване на подход за дългосрочното съхранение на селектираните високопродуктивни линии.

В настоящата дисертация видовете от род *Pulsatilla*, характерни за балканската флора, са селектирани като перспективен обект за биотехнологична разработка поради идентифицираните в надземната част на *P. balcana* недокладвани досега съединения с фенолна структура. Извършеното сравнение на количественото съдържание на вторични метаболити в *ин vitro* култура показва видовата специфичност на отговора към различните комбинации от растежни регулатори. Направен е опит за установяване на зависимост между повишеното количествено съдържание на вторични метаболити с фенолна структура и съотношението chl a/b *ин vitro*. Получените резултати биха могли да се приемат като индикация за възможна връзка между по-ефективното

протичане на фотосинтезата поради благоприятните физиологични условия при някои от вариантите хранителни среди и подобрения капацитет за биосинтез на фенолни съединения. Дискутираните в настоящата работа резултати са едва малка стъпка към по-широкото бъдещо изследване на поставения проблем, с оценка на реалната ефективност на фотосинтезата при съответните варианти хранителни среди и евентуалното селектиране на този фактор като предпоставка при оптимизирането на биосинтеза *ин vitro*. Също така, предмет на бъдеща разработка е и изолирането и идентифицирането на индивидуални вещества от видове от род *Pulsatilla* в култура.

Балканският ендемичен *Hypericum rumeliacum* е избран като подходящ обект за продукцията на хиперицин/псевдохиперицин при *ин vitro* условия, поради това, че той принадлежи към една от филогенетично по-развитите секции на рода (*Drosocarpium*). Извършеното в настоящата работа сравнение на съдържанието на хиперицин/псевдохиперицин в проби от естественото находище на *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum* потвърждават това предположение и въз основа на това видът е въведен в *ин vitro* култура. Въведени са също така *H. tetrapterum* и *H. calycinum* (хиперицин непродуциращ), като сравнението на определени показатели и при трите вида дава възможност да се извърши оценка на някои от факторите, свързани с продукцията на хиперицин/псевдохиперицин *ин vitro*. Установено е, че прилагането на витамини по Gamborg стимулира *ин vitro* мултипликацията, продукцията на хиперицин/псевдохиперицин, и води до повишаване на количествата на малондиалехид и водороден пероксид. В така формираните надземни части има изразено по-нисък индекс на компактност, което е индикация за преобладаването на стъблена тъкан. Прилагането на витамини по Murashige и Skoog води до формирането на аксиларни разклонения с по-компресиран растеж, в които преобладава листната тъкан. При тези варианти се наблюдават повишени количества на феноли и флавоноиди. Установено е, че повишението на малондиалдехида и водородния пероксид *ин vitro* корелира с продукцията на хиперицин и псевдохиперицин и няма връзка с количественото съдържание на феноли и флавоноиди. Също така и при двата хиперицин

продуциращи вида, при двата варианта среди с модифициране на витаминния състав, се установява пряка връзка между гъстотата на разпределение на хиперицинови жлези на mm^2 и количественото съдържание на хиперицин/псевдохиперицин.

В настоящата дисертация се описват първите експерименти по криопрезервация на *H. rumeliacum* чрез витрификация и бавно охлаждане. Извършена е оценка на количественото съдържание на феноли/флавоноиди и хиперицин/псевдохиперицин при три линии растения, регенерирани след замразяване чрез витрификация и съхранение в течен азот. Установено е, че съхранението в течен азот не нарушава биосинтетичния потенциал по отношение на изследваните вторични метаболити, като дори при линията, претретирана за 7 дни в $0,076\mu\text{M}$ АВА се установява повече от двойно повишение на количествата на хиперицин/псевдохиперицин.

Направена е и оценка на възстановяването на антиоксидантните ензимни системи на растенията след криопрезервация. Установено е, че растенията се характеризират с все още понижена активност на аскорбат пероксидазата *AP* (*EC 1.11.1.11*), каталазата (*EC 1.11.1.6*) и глутатион редуктазата *GR* (*EC 1.6.4.2*), като при сравнението между трите линии регенеранти, най-високи стойности за тези активности са установени при линията, прекултивирана за 7 дни в $0,076\mu\text{M}$ АВА. Извършените в допълнение изследвания на условията на прекултивиране на растенията преди замразяването им в течен азот показаха, че с удължаване на времето на прекултивиране, се понижават нивата на малондиалдехид и водороден пероксид и се повишава количеството на натрупани захари. Въз основа на тези наблюдения се прави заключението, че по-продължителното прекултивиране е важна предпоставка за преодоляване на раневия стрес от манипулациите, извършвани върху експлантите преди тяхното замразяване. Необходимо е провеждането на по-нататъчни експерименти по оптимизирането на условията в протокола за криопрезервация, за да се постигне по-добър резултат по отношение на процента на регенерация след замразяването в течен азот на *H. rumeliacum*.

Като общо заключение може да се каже, че методите на растителната биотехнология могат успешно да бъдат прилагани за добива на вторични метаболити при лабораторни условия и дългосрочно запазване на биосинтетичния потенциал *ин vitro* чрез криопрезервация.

Изводи

1. От надземната част на диворастващата *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*, са изолирани и идентифицирани цикориева киселина; 1'-ферулоил-глюкопиранозил (1→2) глюкоза и кафеена киселина. Въз основа на това, видовете от този род са избрани като подходящ обект за изследване на вторични метаболити с фенолна структура *ин vitro*.

2. Селектирани са варианти на хранителни среди за получаване на висок добив на фенолни вещества *ин vitro* при *P. montana* ssp. *balcana*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae*.

3. Установено е, че количеството на хиперицин при *H. rumeliacum* значително надвишава това при *H. tetrapterum* в проби от естественото находище. Докато фенолите и флавоноидите при *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum* са съизмерими, то при хиперицин непродуциращия *H. calycinum* те надвишават двойно количествата, установени при другите два вида.

4. В среда с витаминен състав по Gamborg, хиперицините при *H. rumeliacum*, се повишават значително в сравнение с пробите от естественото находище. Съдържанието на хиперицини при *H. rumeliacum* *ин vitro*, значително надвишава това при *H. tetrapterum*. Докато съдържанието на феноли и флавоноиди при *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum* е съизмеримо, то при хиперицин непродуциращия *H. calycinum* те са значително завишени спрямо установените при двата хиперицин-продуциращи вида *ин vitro*.

5. Добавянето на витамини по Gamborg в хранителната среда стимулира *ин vitro* мултипликацията, понижава количеството на фенолни съединения и стимулира продукцията на хиперицини. Витамините по Murashige и Skoog водят до по-слаба мултипликация, формиране на по-сбити стъбла, намалена продукция

на хиперицини и завишена продукция на феноли/флавоноиди. Завишението на малондиалдехида и водородния пероксид е в положителна зависимост с продукцията на хиперицин/псевдохиперицин и не е зависимо от количествата на феноли и флавоноиди при *Hypericum in vitro*.

6. Развит е и е приложен модел за двустъпално култивиране на *H. rumeliacum*, позволяващ натрупване на биомаса и запазване на капацитета за продукция на феноли и флавоноиди *in vitro*.

7. Доказано е, че съхранението чрез криопрезервация не нарушава биосинтетичния капацитет при *in vitro* култивиран *H. rumeliacum*. В изследваните линии регенерирани растения, фенолите, флавоноидите, хиперицина, псевдохиперицина и съотношението хиперицин/псевдохиперицин са съизмерими, а при едната от линиите хиперицините са завишени двойно спрямо контролните растения.

8. Установено е, че повишението на малондиалдехида и водородния пероксид, генерирани преди самото замразяване, води до по-слабото възстановяване на антиоксидантните ензимни системи при регенерираните растения, дори повече от година и половина след тяхното размразяване. Въз основа на този резултат е направено заключението, че по-дългото прекултивиране би допринесло за по-успешното преодоляване на механичния стрес от манипулациите, предшестващи замразяването в течен азот.

Справка за научните приноси

1. За пръв път са въведени в *in vitro* култура балканските ендемити *Pulsatilla montana* ssp. *balcana*, *P. halleri* ssp. *rhodopaea* и *P. slaviankae* и чрез подбор на хранителните среди е получено повишение на съдържанието на фенолни съединения *in vitro*.

2. За пръв път от представител от род *Pulsatilla* е изолирана терапевтично ценната цикориева киселина. Фенолният диглюкозид 1'-ферулоил-глюкопиранозил (1→2) глюкоза е ново природно съединение.

3. За пръв път са въведени и охарактеризирани *ин vitro* култури от надземни части на *Hypericum rumeliacum* и *H. tetrapterum*.

4. Установено е, че в зависимост от витаминния състав на хранителната среда, може да се повиши съдържанието на феноли, флавоноиди, хиперицин и псевдохиперицин в изследваните видове от род *Hypericum*.

5. Установена е положителна зависимост между съдържанието на хиперицини и гъстотата на разпределение на хиперициновите жлези при *H. rumeliacum* и *H. tetrapterum in vitro*.

6. За пръв път е осъществена регенерация на балканския ендемит *H. rumeliacum* след криопрезервация на върхни стъблени експланти.

Списък на публикациите по темата на дисертацията

1. Danova K, Damianova P, Kapchina-Toteva V (2007) Utilization of the methods of *in vitro* propagation for resource purposes in medicinal plants breeding. In vitro cultivation of some *Hypericum* species. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans 10(6): 1074-1089.
2. Danova K, Markovska Y, Dimitrov D, Kapchina-Toteva V. (2007) *In vitro* culture initiation and phenol and flavonoid determination of some medicinal plants, endemic to the Balkan flora, Proceedings book of International scientific Conference Stara Zagora "Challenges for Bulgarian Science in This Country's EU Membership" JUNE 7-8, 2007, vol. 1 "Plant breeding", pp 222 - 229.
3. Danova K, Bertoli A, Pistelli Laura, Dimitrov D, Pistelli Luisa (2009) In vitro culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. Botanica Serbica, 33(2): 157-162.
4. Danova K, Kapchina-Toteva V (2009) Cryopreservation – a new method for conservation of *Hypericum rumeliacum* Boiss. Proceedings of the International Scientific Conference (June, 2009, Stara Zagora, Bulgaria), vol. 3 "Medical Biol. Studies", pp 90-95.
5. Danova K, Urbanová M, Skyba E, Čelárová M, Stefanova D, Koleva V, Kapchina-Toteva V (2009) Impact of cryopreservation on biochemical parameters of *in vitro* cultured *Hypericum rumeliacum* Boiss. Proceedings of International Symposium "New Research in Biotechnology" (19-20 Nov, Bucharest), pp 78-85.
6. Danova K (2010) Production of polyphenolic compounds in shoot cultures of *Hypericum* species characteristic for the Balkan Flora. Botanica Serbica, **in press for 2010**, number 34(1).
7. Danova K, Čelárová E, Kapchina-Toteva V (2010) Impact of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Hypericum rumeliacum* Boiss. Journal of Environmental Prot and Ecol, in press.
8. Danova K., Čelárová E., Macková A., Daxnerová Z., Kapchina-Toteva V. **In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids**, In Vitro Cell and Dev Biology – Plant, Springer NY, copy editing in process.

Участия в научни конференции по темата на дисертацията

1. Danova K, Markovska Y, Dimitrov D, Kapchina-Toteva V (2007) *In vitro* culture initiation and phenol and flavonoid determination of some medicinal plants, endemic to the Balkan flora, International Scientific Conference Stara Zagora "Challenges for Bulgarian Science in This

Country's EU Membership" JUNE 7-8, 2007 – устен доклад; получена Грамота за най-добре представил се млад автор към секция „Генетика и селекция, плевели, болести и неприятели”.

2. **Danova K, Kapchina-Toteva V (2007)** In vitro culture initiation of three Balkan endemic *Pulsatilla* species, Workshop on biological activity of plants and other natural products, Institute of Experimental Pathology and Parasitology, June 25-26, Sofia – постер.
3. **Danova K, Čellárová E, Kapchina-Toteva V (2008)** In vitro conservation of rare and endemic plant species. Production of phenolics and flavonoids of *Hypericum rumeliacum* Boiss. shoot cultures, Seminar of Ecology, 17-18 April, 2008, Sofia. – устен доклад
4. **Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čellárová E, Kapchina V (2009)** Evaluation of some physiological markers in Balkan endemic *Hypericum rumeliacum* Boiss. regenerated after cryopreservation, 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species (5-8 April 2009, Leuven, Belgium) Book of abstracts p. 73.
5. **Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čellárová E, Kapchina V (2009)** Utilization of the methods of plant biotechnology for conservation of medicinal plant species. BT-p 45, XI Anniversary Scientific Conference “Biology – Traditions & Challenges” (27-29 May, 2009 – Sofia).
6. **Danova K, Kapchina-Toteva V (2009)** Cryopreservation – a new method for conservation of *Hypericum rumeliacum* Boiss. Proceedings of the International Scientific Conference (June, 2009, Stara Zagora, Bulgaria), vol. 3 “Medical Biol. Studies”, pp 90-95.
7. **Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čellárová E, Stefanova M, Koleva D, Kapchina-Toteva V (2009)** Impact of cryopreservation on biochemical parameters of in vitro cultured *Hypericum rumeliacum* Boiss., International Symposium “New Research in Biotechnology” (19-20 Nov, Bucharest), pp
8. **Danova K (2009)** Production of polyphenolic compounds in shoot cultures of *Hypericum* species characteristic for the Balkan Flora. 5th Balkan Botanical Congress (7 – 11 Sept, Belgrade), Poster8_PPR_P_26. Book of abstracts, pp 151-152
9. **Danova K, Bertoli A, Pistelli Laura, Dimitrov D, Pistelli Luisa (2009)** In vitro culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. 5th Balkan Botanical Congress (7 – 11 Sept, Belgrade), Poster8_PPR_P_13. Book of abstracts, pp 145-146

Цитирана литература

- Aebi H (1984)** Catalase *in vitro*, Methods of Enzymology, (Eds., SD Colowick, NO Caplan) Academic Press, NY, 105: 121-126.
- Balogh MP and Li JB (1999)** HPLC Analysis of Hypericin with PDA and MS Detection, LC-GC Europe, Volume 17, No. 6, pp. 556-562
- Bauer R (1999)** Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals. In: Wagner H (ed.) Immunomodulatory agents from plants. Birkhauser Verlag, Basel. 41-88.
- Bauer R (2000)** Chemistry, pharmacology and clinical application of *Echinacea* products. In: Mazza G and Oomah BP (eds.) Herbs, botanicals and teas. Technomic Publ. Co. Inc, Lancaster. 44-74.
- Bertoli, A., Giovannini, A., Ruffoni, B., Di Guardo, A., Spinelli, G., Mazzetti, M., Pistelli, L. (2008)** Bioactive constituent production in St. John's Wort in vitro hairy roots. Regenerated plant lines. Volume 56, Issue 13, 9 July 2008, Pages 5078-5082
- Danova K (2010)** Production of polyphenolic compounds in shoot cultures of *Hypericum* species characteristic for the Balkan Flora. Botanica Serbica, **in press for 2010**, number 34(1).
- Danova K, Kapchina-Toteva V (2009)** Cryopreservation – a new method for conservation of *Hypericum rumeliacum* Boiss. Proceedings of the International Scientific Conference (June, 2009, Stara Zagora, Bulgaria), vol. 3 “Medical Biol. Studies”, pp 90-95.
- Danova K, Bertoli A, Pistelli Laura, Dimitrov D, Pistelli Luisa (2009a)** In vitro culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. Botanica Serbica, 33(2): 157-162.
- Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čellárová E, Kapchina V (2009b)** Evaluation of some physiological markers in Balkan endemic *Hypericum rumeliacum* Boiss. regenerated after cryopreservation, 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species (5-8 April 2009, Leuven, Belgium) Book of abstracts p. 73.
- Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čellárová E, Kapchina V (2009c)** Utilization of the methods of plant biotechnology for conservation of medicinal plant species. BT-p 45, XI Anniversary Scientific Conference “Biology – Traditions & Challenges” (27-29 May, 2009 – Sofia).

- Danova K, M. Urbanová, M. Skyba, E. Čelárová, M. Stefanova, D. Koleva, V. Kapchina-Toteva (2009d)** Impact of cryopreservation on biochemical parameters of in vitro cultured *Hypericum rumeliacum* Boiss. Proceedings of International Symposium "New Research in Biotechnology" (19-20 Nov, Bucharest), pp 78-85.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 350-356.
- Doulis AC, Debian N, Kingston-Smith AH and Foyer CH (1997)** Differential Localization of Antioxidants in Maize Leaves. *Plant Physiol.* 114: 1031-1037
- Foyer C, Rowell J and Walker D (1983)** Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta.* 157: 239-244
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968)** Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50, 151-158.
- Häberlein H, Tschiersch KP, Stock S, Höhl J (1992)** Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.), *Pharm. Ztg. Wiss.*, 137: 169-174
- Jessup W, Dean RT, Gebicki JM (1994)** Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Method Enzymol* 233:289-303.
- Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, Heo YS, Lee HJ and Dong Z (2009)** Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis.* 30 (2): 321–330
- Krämer W and Wiartall R (1992)** Bestimmung von Naphthodianthronen (Gesamthypericin) in Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) *Pharm. Ztg. Wiss.*, 137: 202-207
- Lin FH, Lin JY, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Selim AM, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Zielinski J & Pinnell SR (2005)** Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 125, 826–832
- Lohachoompol V, Srzednicki G, & Craske J. 2004.** The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 5: 248–252.
- Lowry OH, Rosenbough NY, Farr AL, Randall RY (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Moran R.** 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-Dimethylformamide, *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497
- Nakano Y and Asada K (1981)** Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 22, No. 5: 867-880
- Němec B (1962)** Botanická mikrotechnika. ČSAV Praha 123-124
- Ou S, Kwok K-C (2004)** Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agric.* 84:1261–1269
- Perry NB, Burgess EJ, Glennie VL (2001)** *J Agric Food Chem* 49:1702–1706
- Sherwin HW and Farrant JM (1998)** Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Reg* 24:203–210.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM.** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299: 152-178.
- Yuan YJ, Li C, Hu ZD, Wu JC, Zeng AP (2002)** Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production *Process Biochemistry* 38: 193-198
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W.** 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.