

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет

Катедра “Физиология на растенията”



Жени Димитрова Нанова

МИКРОРАЗМНОЖАВАНЕ НА БЯЛ РИГАН
(*ORIGANUM VULGARE* SSP. *HIRTUM* (LINK) IETSWAART) И
ИСОП (*HYSSOPUS OFFICINALIS* L.) И ОЦЕНКА НА
ТЯХНАТА ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Професионално направление 4.3. Биологически науки
Докторска програма Физиология на растенията

Научен консултант:
проф. д-р Венета Капчина – Тотева

София, 2014 г.

Дисертационният труд съдържа 137 страници и е онагледен с 31 фигури и 21 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 352 литературни източника, от които 14 на кирилица и 338 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, проведено на 12.02.2014 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2014 г. от ч. в зала на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- A-250 – производно на маслена киселина, мироеlementи, витамини
БАВ – биологично активни вещества
БАП (БА) – 6-бензиламино-пурин, бензиладенин
БИ – бензимидазол
ИМК – β -индолил-маслена киселина
ИОК – β -индолил-3- оцетна киселина
МИ – митотичен индекс
ММС – метил метансулфонат (Methyl MethaneSulfonate)
НОК – α - нафтил оцетна киселина
Ost, Og1, Og2, Og3 – варианти бял риган, получени чрез микроразмножаване от едно и също майчино растение, но от различни експланти: Ost (**O**regano **s**tem **t**ips) – от стъблени връхчета; Og1, Og2 и Og3 (**O**regano **s**eed **g**erm) – от кълнове от три семена
ПП-40 – производно на фенокси оцетна киселина и фолиева киселина
ПФ-32 – производно на фенокси оцетна киселина, витамини
ФИ – фазов индекс
СЕ – студен екстракт
ГЕ – горещ екстракт

УВОД

Белият риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Jetsvaart) и исопът (*Hyssopus officinalis* L.) принадлежат към семейство Lamiaceae. Повечето от представителите на семейството, включително белия риган и исоба, съдържат етерични масла, което обуславя широкото им приложение като подправки, лечебни растения, суровина в парфюмерията и козметиката.

През последните години интересът към природната медицина все повече нараства. Фитотерапията предлага алтернативно лечение и може да повлияе ефективно различни заболявания. Много ценни лечебни растения намаляват и изчезват поради прекомерна експлоатация и неправилно събиране. Един от основните начини да се намали негативното влияние върху диворастящите ресурси е растението да се култивира. Това налага необходимост от разработване на

методи за бързо и ефективно размножаване. Семенното размножаване е лесно осъществимо, но има съществен недостатък – при кръстосаноопрашващи се растения потомството от семена е генетично разнородно и получените растения се различават по отношение на хабитус, оцветяване, състав на етеричното масло и др. Това е основната причина да се предпочита вегетативното размножаване, при което се запазва генотипа на изходните растения. При вегетативното размножаване обаче от едно изходно растение годишно могат да се получат ограничен брой нови растения. Това налага търсене на други начини за размножаване. В наши дни метода на микроразмножаване се използва за получаване на голям брой индивиди с ценни качества от едно изходно растение. В резултат от тази ускорена форма на размножаване се получават здрави растения, което води до по-висока икономическа ефективност. Успешното микроразмножаване зависи от редица фактори, като вида на изходния експлант, концентрацията и комбинацията на растежните регулатори.

Образуването и отделянето на фитотоксини от някои растения и техните остатъци е добре известно явление. Най-често наблюдаваните ефекти включват понижена кълняемост на семената и растеж на прорастъците. Поради това култивирането на растения в селското стопанство изисква оценяване на техния аделопатичен потенциал. От друга страна необходимостта от ограничаване на използването на пестициди в селското стопанство налага проучвания относно естествени биологично активни вещества, които да се използват за борба с вредителите. Лабораторните изследвания са първата стъпка в изучаване на влиянието на фитотоксичните вещества. Повечето проучвания са относно аделопатичната активност на етеричните масла, но някои изследвания показват наличие на аделопатичен потенциал на водни екстракти от растенията.

Общоприето е, че билковите лекарства са безвредни, защото са природни продукти. Билковите препарати обаче, дори когато са приготвени само от едно растение, представляват сложни биологични смеси. Информацията относно биологичната активност на билковите лекарства е непълна. Този проблем е особено актуален и през последните години е обект на проучване от много изследователски колективи. Получените

резултати показват, че много от използваните в традиционната медицина растения оказват негативно влияние върху дялящи се клетки *in vitro* и *in vivo*. Това поражда опасения, че продължителното им използване може да представлява риск за здравето. За да се осигури относително безопасното използване на лечебните растения е необходимо да се направи оценка на влиянието им върху дялящи се клетки. В подобни изследвания широко се използва *Allium cepa* L.-тестът, който се отличава с висока чувствителност и добра корелация с резултатите, получени посредством други тест-системи.

Естествените находища на белия риган и исоба в България не могат да осигурят достатъчно растителна суровина. Успешното микроразмножаване може да осигури достатъчно растения за култивиране в земеделските площи и би допринесло за запазване на естествените хабитати. Съществуват данни за наличие на алелохимикали в тъканите на белия риган и исоба, което налага необходимост от оценяване на техния алелопатичен потенциал. Оценката на влиянието на двете растения върху митотични клетки ще осигури информация относно безопасното им използване от хората.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се проучат възможностите за въвеждане на бял риган (*Origanum vulgare subsp. hirtum* (Link) Ietswaart) и исоп (*Hyssopus officinalis* L.) в култура *in vitro* и да се изследва техния алелопатичен потенциал и влиянието им върху дялящи се клетки.

За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Разработване на система за микроразмножаване и *ex vitro* адаптиране на растенията бял риган и исоп.
2. Морфологична характеристика и анализ на състава на етеричните масла на микроразмножени растения бял риган, получени от различни експлантите и отглеждани при полски условия.
3. Изследване на алелопатичния ефект на водни екстракти от получените растения върху традиционни култури в лабораторни условия.

4. Изследване на влиянието на водни екстракти от получените растения върху клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L.
5. Провеждане на анкетно проучване сред населението относно използването на лечебни растения от сем. Lamiaceae.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнение на задачите, поставени в дисертационния труд са използвани следните методи, описани подробно в дисертацията:

- 1) Микроразмножаване на изследваните растения;
- 2) Морфологична характеристика на микроразмножените растенията от бял риган;
- 3) Извличане на етерично масло чрез водна дестилация;
- 4) Газхроматографски анализ на етерични масла;
- 5) Тестове за оценка на алелопатията: тест за кълняемост на семена и тестове за коренов растеж;
- 6) Тест за оценка на влиянието на екстрактите върху делящи се клетки. *Allium cepa*-тест;
- 7) Анкетно проучване относно използването на лечебни растения от сем. Lamiaceae;
- 8) Статистическа обработка на експерименталните данни: t-критерий на Стюдънт, метода χ^2 , коефициент на взаимосвързаност на Пирсън.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Получаване на *in vitro* култури

1.1. Въвеждане на бял риган и исоп в култура in vitro и мултиплициране на получените растения

При въвеждането на белия риган в култура *in vitro* се наблюдава отпадане на някои от първичните експланти, непонесли добре извършената им стерилизация. В нашия експеримент третирането с 0.04% HgCl₂ и 0.1% Tween-20 в продължение на 30 минути за прорастъците от семена, 60 минути за стъблените връхчета от бял риган и 90 минути за стъблените връхчета от исоп осигурява необходимите асептични култури.

Нормално нарастване и развитие на експлантите от бял риган е наблюдавано едва след едно, а за някои експланти и

след повече субкултивирания. И двете използвани хранителни среди (L^4 и L^{11}) се оказват подходящи за този етап. Общото за тях е, че повлияват благоприятно нарастването на растенията до 3-4 възела, без признаци на отклонение от нормалното им развитие, такива като витрификация, хлороза, некроза и др.

В следващ експеримент е проучено влияние върху микроразмножаването на цитокинина БАП и в комбинация с ауксина НОК (**Таблица 1**). В настоящия експеримент, самостоятелното участие на БАП в средата предизвиква развитие на нови вегетативни издънки от спящите пъпки на подолните възли след около две седмици. Микроразмножаването е осъществявано главно чрез разчленяване на вегетативните части на нодални сегменти, съдържащи един листен възел и прилежащите му две листенца (**Снимка 1-В**). При култивиране на растенията на хранителни среди, съдържащи БАП в концентрации 0.5 или 1 mg/l е наблюдавано вариране на изследваните показатели (**Таблица 1**). При култивирането им върху среда с 0.5 mg/l БАП е отчетено слабо формиране на вегетативни издънки (1.3 броя за експлант със средна дължина 20 mm). При увеличаване концентрация на БАП на 1 mg/l в средата е отчетен по-голям брой вегетативни издънки (2.5 броя за експлант), но с по-малка дължина (16 mm). БАП оказва стимулиращо влияние върху степента на размножаването, като стойностите на проучваните показатели са в зависимост от приложената концентрация. В нашите изследвания добавянето на ауксина НОК в ниска концентрация (0.01 mg/l) към средите, съдържащи с 0.5 или 1 mg/l БАП подобрява степента на размножаване и значително увеличава броя на новообразуваните вегетативни издънки. Хранителната среда, съдържаща комбинация от 1 mg/l БАП и 0.01 mg/l НОК стимулира растежа и развитието на нови вегетативни издънки – 3.5 броя за експлант със средна дължина 15 mm (**Таблица 1**). Разликите са статистически доказани при $P \leq 0.01$ спрямо контролната хранителна среда. Резултатите показват, че комбинацията БАП (1 mg/l)/НОК (0.01 mg/l) е най-ефективна за размножаването на белия риган.

Таблица 1. Влияние на растежните регулатори върху микроразмножаването на растения от бял риган.

Хранителна среда	Растежни регулатори, mg/l		Брой издънки от един експлант	Дължина на издънките, mm
	БАП	НОК		
L0	-	-	0.2±0.1	5±0.1
L1	0.5	-	1.3±0.1	20±0.4
L11	1	-	2.5±0.3	16±0.2
L2	0.5	0.01	2.9±0.4	18±0.3
L3	1	0.01	3.5±0.6	15±0.2

Данните са представени като стойности \pm m (стандартна грешка).

Многократното субкултивиране е един от начините за получаване на нови растения. В настоящото изследване растенията са субкултивирани четирикратно на оптималната за размножаване хранителна среда и са получени голям брой нови растения. Степента на микроразмножаване нараства с напредване на пасажите като във втори пасаж броят на вегетативни издънки за експлант е 5.8; в трети пасаж – 6.6 броя издънки/експлант, а в четвърти – 7.5 броя/експлант. Резултатите показат, че честотата на мултиплициране не затихва за проучвания период.

На използваните хранителни среди (съдържащи препаратите БИ и ПП-40 самостоятелно в различни концентрации) за въвеждане на исоба в тъканна култура, по-голяма част от първоначално заложените експлантите от стъблени връхчета остават жизнеспособни. При култивирането на експлантите в условия *in vitro* не е наблюдавано бактериално заразяване, което се дължи на успешната стерилизация. В продължение на две или три субкултивирания са наблюдавани съвсем слаби признаци на развитие. След този етап, адаптирането *in vitro* приключва, експлантите възстановяват растежа и развитието си, които протичат нормално, без признаци на нежелани отклонения като хлорози, некрози, витрификация и др. В продължение на едно субкултивиране, те се оформят като растения с по 4 до 6 възела, които след разчленяване осигуряват мултиплицирането на исоба (**Снимка 2-В**). Оптимално подобрите хранителни среди, съдържащи

препаратите БИ (0.5 mg/l) или ПП-40 (0.5 mg/l) самостоятелно, осигуряват бърз растеж и развитие на експлантите.

1.2. Вкореняване на бял риган и исон в условия *in vitro*

Значително подобряване на вкореняването при белия риган е постигнато с използване на ауксина ИОК вместо НОК в хранителната среда (**Снимка 1-А**). Резултатите от проведения експеримент са представени в **Таблицы 2 и 3**.

Таблица 2. Влияние на различни концентрации от ауксина ИОК върху *in vitro* вкореняването на бял риган.

Хранителна среда	ИОК (mg/l)	Растения, получени от изходен експлант стъблени връхчета		Растения, получени от изходен експлант прорастъци от семена	
		Използван и растения (брой)	Вкоренен и растения (%)	Използван и растения (брой)	Вкоренен и растения (%)
Контрола	0.00	53	100.00	60	26.8±5.6
1	0.07	63	100.00	71	66.4±4.3
2	0.10	62	100.00	68	68.9±6.6
3	0.15	62	100.00	70	80.5±4.7
4	0.20	30	100.00	32	54.2±7.2

Данните са представени като стойности ± m.

Таблица 3. Някои биометрични параметри на *in vitro* вкоренените растения от бял риган.

Хранителна среда	Дължина на стъблото (mm)	Среден брой корени	Дължина на корена (mm)
контрола	31.9±2.0	1.4±0.4	6.1±1.0
1	32.5±0.9	2.4±1.9	6.9±0.6
2	30.4±1.2	2.9±0.3	7.4±0.7
3	33.8±1.6	5.1±0.3	10.6±0.5
4	30.3±1.9	3.1±0.6	4.7±0.7

Данните са представени като стойности ± m.

Растенията, получени от двата вида изходни експлантите (стъблени връхчета и прорастъци от семена), показат различен *in vitro* отговор (**Таблица 2**). Тези, които са получени от изходен

експлант стъблени връхчета, показват 100% вкореняване на всички използвани хранителни среди. Тези, при които като изходен експлант са използвани прорастъци от семена, се вкореняват по-трудно. При растенията получени от двата вида изходни експлант формиране на корени е наблюдавано на всички пет проучвани хранителни среди, от които едната, използвана като контрола е без участие на растежен регулатор. На нея индуциране на корени е наблюдавано след деветия ден от култивирането, но в повечето случаи те са единични и лесно се късат. При растенията, получени от изходен експлант прорастъци от семена, средния процент на вкореняване на контролната среда е най-нисък – 26.8 ± 5.6 . Този резултат значително се променя с използването на ауксина ИОК в концентрации от 0.07, 0.10 и 0.15 mg/l в следващите три хранителни среди, където вкореняването нараства. Най-висок процент вкореняване при растенията, произхождащи от прорастъци от семена, е получен на хранителна среда 3 – 80.5 ± 4.7 . За растенията е характерно добро нарастване, нормално развитие и интензивно зелени листа. Корените са бели, здраво закрепени за основата на растенията, която е без удебеления и калус. Повишеното до 0.20 mg/l количество на ИОК в хранителната среда (четвърта) предизвика някои негативни прояви, което е показател, че оптималната концентрация е надвишена. Растенията нарастват, но вече са бледи, жълтеникави, а долните листа на повечето от тях, към края на пасажа, са напълно некротирани. За нея са отбелязани и най-късите корени – 4.7 ± 0.7 mm което показва, че е надхвърлена оптималната концентрация на тествания ауксин (**Таблица 3**). Най-ефективна се оказва 3-та хранителна среда с 0.15 mg/l ИОК в нея. По показателя процент вкореняване, тя превъзхожда останалите четири с много добра достоверност ($P < 0.001$). Заедно с високият процент вкореняване, при нея са наблюдавани и по-голям брой корени (5.1) със средна дължина – 10.6 mm (**Таблица 3**). При отчитане на биометричните показатели растенията от двете групи (от изходен експлант стъблени връхчета и от изходен експлант прорастъци от семена) са обединени. Резултатите са представени в **Таблица 3**.

Оптимизиране на хранителните среди за *in vitro* вкореняване на исопа е постигнато със серия от опити с

участието на ауксина ИОК и препарата БИ в хранителната среда. Получените резултати са представени в **Таблица 4**.

Таблица 4. Вкореняване на исоп на хранителни среди, съдържащи ауксина ИОК и препарата БИ.

№	Хранителни среди съдържащи:		Използвани растения (брой)	Вкоренени растения (%)	Среден брой корени	Дължина на корена (mm)	Дължина на стъблото (mm)
	ИОК (mg/l)	БИ					
К	-	-	112	10.7±2.9	1.0±0.1	3.1±1.1	21.1±0.8
2	1.0	-	113	63.7±4.5	3.0±0.3	2.9±0.3	42.3±2.1
3	0.5	-	108	71.3±4.4	2.8±0.3	4.4±0.5	45.1±1.9
4	0.1	-	148	77.0±3.5	3.1±0.2	12.7±0.9	69.4±3.0
5	0.1	0.1	100	90.0±3.0	2.6±0.1	7.7±0.5	30.5±1.2
6	0.1	0.05	144	52.8±4.2	2.1±0.1	3.7±0.5	17.4±1.1
7	0.05	0.05	154	63.4±3.9	2.5±0.1	12.1±1.2	64.3±3.1

Данните са представени като стойности ± m.

На контролната хранителна среда (К, без участие на ИОК и БИ) са регистрирани най-малко вкоренени растения (10.7±2.9%). Корените са единични, слабо нарастнали, а средно нарастналата стъблена част (21.1±0.8 mm) е бледа, със склонност към засукване на листата. Включването на 1.0 mg/l ИОК във 2^{-ра} хранителна среда повишава вкореняването на 63.7±4.5%, но отчитайки ефекта върху цялостното развитие на растенията, тя не може да се препоръча за използване. Растенията нарастват двойно спрямо контролните (42.3±2.1 mm) за сметка на удължаване на междувъзлията. На цвят са бледозелени, с удебеления в основата, а при някои и калус от 0.8 до 10.0 mm в диаметър. Корените лесно се отделят от стъблото. Подобно развитие е установено и за растенията, култивирани на следващите две хранителни среди (3^{-та} и 4^{-та}), където ИОК е в концентрация 0.5 и 0.1 mg/l съответно. При тях вкореняването се повишава на 71.3% и 77.0%, но калусогенезиса на основите не затихва и корените лесно се късат. При 5^{-та} хранителна среда заедно с 0.1 mg/l ИОК е добавен и 0.1 mg/l БИ. Включването на посочената концентрация от БИ в тази хранителна среда

потиска калусогенезиса, растенията се развиват нормално (височина 30.5 ± 1.2 mm). Те са интензивно зелени, с уголемени листа, без признаци на встъкляване, корените са здраво свързани със стъблото (**Снимка 2-А**). Това и вкореняването от $90.0 \pm 3.0\%$, прави тази хранителна среда подходяща за използване. По показателя процент вкореняване, тя превъзхожда останалите хранителни среди с много добра математическа достоверност ($P < 0.001$).

Оптимално подобрите концентрации от ИОК и БИ се потвърждават и от резултатите получени на следващите две хранителни среди (6^{-та} и 7^{-ма}), където заедно с 0.1 и 0.05 mg/l ИОК, са добавени и 0.05 mg/l БИ. Заниженото количество от БИ не се оказва достатъчно за потискане на установения негативен ефект от самостоятелното участие на 1.0 , 0.5 и 0.1 mg/l ИОК в предните хранителни среди (2, 3 и 4^{-та}). Растенията отново са бледи, изкривени, със засукани листа и калус в основата, което прави тези хранителни среди неподходящи за използване.

Данните представени в **Таблица 4** показват също така и влиянието на посочените концентрации и съотношения на ИОК и БИ върху дължината на корена и стъблото. Те са с най-ниски стойности (2.9 и 42.3 mm съответно) на 2^{-та} хранителна среда, където ИОК присъства в най-висока концентрация – 1.0 mg/l. С понижаване на концентрациите, техните стойности се увеличават до 12.7 mm за корена и 69.4 mm за стъблото за средата с 0.1 mg/l ИОК (4^{-та}). Съвместното включване на 0.1 mg/l ИОК и БИ в 5^{-та} хранителна среда (най-подходящата от проучваните) доведе до формирането на растения със средно дълги корени (7.7 ± 0.5 mm) и стъбло (30.5 ± 1.2 mm).

1.3. Адаптиране на микроразмноженията растения в ex vitro условия

Прехвърлянето на вкоренените растения бял риган от *in vitro* в *ex vitro* условия става след 25-тия ден от култивирането. Резултатите от влиянието на тестваните торфени субстрати върху оцеляването на растенията от бял риган са представени в **Таблица 5**. Данните в таблица **Таблица 5** показват, че най-висок процент преживяемост на растенията е получен след прехвърлянето им на М1 – смес от торф и перлит в обемно съотношение 2:1. По време на адаптирането е наблюдавано, че

растенията на тази смес бързо нарастват и са с добре развити тъмнозелени листа (**Снимка 1-С**). Другите две смеси също са подходящи за аклиматизиране на растенията, тъй като степента на преживяемост е висока (90% и 80%, съответно за смеси М2 и М3). Приложените техника и торфени смеси позволяват успешното прехвърляне на растенията от *in vitro* в *ex vitro* условия. След едномесечно култивиране стъблената част на растенията се изрязва до най-долният възел, разположен над повърхността на сместа. Тази процедура стимулира развитието на повече от една вегетативни издънки от основата на растенията и до края на втория месец те са готови за засаждане при полски условия (**Снимка 1-Д**).

Таблица 5. Влияние на торфения субстрат върху степента на преживяемост на растенията от бял риган по време на адаптирането в условия *ex vitro*.

№	Торфена смес	Брой засадени растения	Преживяемост на растенията, %
М1	Торф: Перлит (2:1)	60	95
М2	Торф: Перлит: Пясък (2:1:1)	40	90
М3	Торф: Пясък (2:1)	40	80

Вкоренените растения от исоп успешно са адаптирани в условия *ex vitro* директно в торфена смес – торф:пясък:перлит (1:1:1). Установените оптимални условия за адаптиране на растенията от исоп позволяват преживяемостта им да достигне до 90-95 % след 4 седмици на култивиране (**Снимка 2-С**). След 45 до 60 дена на адаптиране, растенията са готови за пренасянето им на постоянно място на полето (**Снимка 2-Д**).

In vitro размножаването широко се прилагат при редица ароматни растения като алтернатива на конвенционалното вегетативно размножаване (Jain и Saxena, 2009). Разработените от нас протоколи за мултиплициране на бял риган и исоп могат да се използват за масово производство на еднородни и здрави растения.



A



B



C



D

Снимка 1. Размножаване на бял риган в *in vitro* условия: А – вкоренени *in vitro* растения бял риган на среда, съдържаща 0.15 mg/l ИОК; В – връхни и нодални сегменти от бял риган; С - адаптирани в *ex vitro* условия растения от бял риган на смес от торф и перлит в обемно съотношение 2:1; D - експериментално насаждение на територията на Земеделски институт-Шумен от *in vitro* размножен бял риган на II^{-та} година от засаждането.



А

В



С

Д

Снимка 2. Размножаване на исоп в *in vitro* условия: А – вкоренени *in vitro* растения исоп на среда, съдържаща 0.10 mg/l ИОК и 0.10 mg/l БИ ; В – връхни и нодални сегменти от исоп; С – адаптирани в *ex vitro* условия растения от исоп на смес от торф, пясък и перлит в обемно съотношение 1:1:1, D – експериментално насаждение на територията на Земеделски институт-Шумен от *in vitro* размножен исоп на II-та година от засаждането.

2. Морфологична характеристика и етеричномаслен състав на микроразмножен бял риган, отглеждан при полски условия

2.1. Морфологична характеристика

Получените чрез микроразмножаване четири варианта бял риган (Ost (**O**regano **s**tem **t**ips) – от стъблени връхчета; Og1, Og2 и Og3 (**O**regano **s**eed **g**erm) – от кълнове от семена) имат различен хабитус. От **Таблица 6** се вижда, че диаметърът на туфата показва близки стойности при четирите варианта (между 42 и 44 cm). Броят на стъблата в туфа варира от 72.57 за растенията от вариант Og3 до 33.43 за тези от вариант Og1, като

разликата между тях е 39.14 броя стъбла. Най-високи са стъблата при вариант Ost (средно 94.55 cm), а най-ниски – при вариант Og3 (средно 44.75 cm), като разликата между двете височини е значителна – 49.80 cm. Растенията Ost и Og1 имат два пъти по-високи съцветия (около 27 cm) от Og2 и Og3 (около 13 cm).

Таблица 6. Някои биометрични параметри на изследваните варианти бял риган.

Вариант растение	Диаметър на туфата (cm) ± m	Брой стъбла в туфа ± m	Височина на стъблата (cm) ± m	Височина на съцветията (cm) ± m	Брой възли ± m
Ost	41.90±1.19	70.43±3.03	94.55±0.86	27.79±0.73	30.51±0.21
Og1	42.33±1.27	33.43±1.43	54.67±0.88	27.27±0.50	18.52±0.16
Og2	44.13±0.77	69.17±2.52	44.76±0.64	12.82±0.39	20.39±0.29
Og3	43.45±0.76	72.57±2.66	44.75±0.64	12.73±0.30	18.50±0.13

Данните са представени като средни стойности ± m.

2.2. Етеричномаслен състав

Резултатите от изпитването на етеричните масла са представени в **Табл. 7**. Съдържанието на етерично масло в проучваните растения от бял риган варира от 1.30 до 1.56 ml/100 g. Установяваме различия в състава на етеричните масла при растенията, получени от стъблени връхчета (Ost) и от прорастъци от семена (Og1, Og2, Og3) от едно майчино растение.

Основните съставки на етеричните масла на четирите варианта са карвакрол, γ-терпинен и *p*-цимен. Относително високото съдържание на карвакрол (>48.29%) и ниското съдържание на тимол (<0.29%) в тестваните от нас растения бял риган ги характеризира като карвакролов хемотип (Kokkini et al., 1989).

В много изследвания е установено, че съставът на етеричното масло при белия риган варира в широки граници. Затова при събиране на растения от естествени хабитати качеството на материала е несигурно, поради което се налага

култивиране на растения в селското стопанство (Goliaris et al., 2002). Интерес представляват резултатите от настоящото изследване, показващи различия в количеството на основните съставки на етеричните масла при четирите варианта бял риган: главната съставка, карвакрола, варира най-силно – от 48.29% до 61.48%; γ -терпиненът – от 16.89% до 26.11% и p -цименът – от 5.94% до 9.73%. Количеството на останалите съставки на етеричните масла не показва съществени различия при четирите варианта бял риган.

Таблица 7. Резултати от изпитването на етеричните масла на изследваните варианти бял риган.

Показател	Микроразмножен бял риган			
	Ost	Og1	Og2	Og3
Етерично масло (ml/100 g)	1.55	1.51	1.30	1.56
Химичен състав (%):				
α - туйен	1.88	1.80	1.54	1.69
α – пинен	0.77	0.76	0.59	0.66
мирцен	2.56	2.35	2.18	2.26
p – цимен	5.94	6.20	9.73	8.97
γ – терпинен	18.83	16.89	26.11	22.29
тимол	0.18	0.27	0.29	0.29
карвакрол	59.55	61.48	48.29	52.15
β –кариофилен	0.99	1.18	1.00	1.79
β – бизаболен	1.15	1.13	1.57	2.16
α - туйен	1.88	1.80	1.54	1.69

Както се вижда от представените данни, тестваните растения бял риган, въпреки че са отгледани при едни и същи условия, показват съществени различия в състава на етеричното масло. Тези данни потвърждват становището, че варирането на

специфичните метаболити при лечебни растения от семейство Lamiaceae до голяма степен се дължи на генетичната хетерогенност (Shetty, 2001). Поради това микроразмножаването *in vitro* е начин да се получат растения с желани качества, които да бъдат използвани за създаване на полски насаждения от генетично еднороден материал.

3. Изследване на аделопатичния потенциал на водни екстракти от микроразмножени бял риган и исоп

3.1. Изследване на влиянието на водни екстракти от микроразмножени бял риган и исоп върху кълняемостта на семена

Изследванията относно биологичните ефекти на вторичните метаболити в лечебните растения са особено актуални през последните години по няколко причини. Една от тях е, че поради прекомерната експлоатация и неправилното събиране много ценни растения намаляват и изчезват. Естествените находища на бял риган и исоп в България не са достатъчни за да задоволят нуждите от тях. Един от основните начини да се намали негативното влияние върху природните ресурси е растенията да се култивират, което изисква оценяване на техния аделопатичен потенциал. Образоването и отделянето на фитотоксини от някои растения и техните остатъци е добре известно явление, като най-често наблюдаваните ефекти включват понижена кълняемост на семената. На базата на литературни данни относно наличието на аделопатични вещества във водни екстракти на риган (Economidou et al., 2007) в диапазон от концентрации 18.75-150 g/l, ние избрахме да тестваме две от изпитваните от нас дози, които са близки до цитираните – 17.5 g/l и 52.5 g/l.

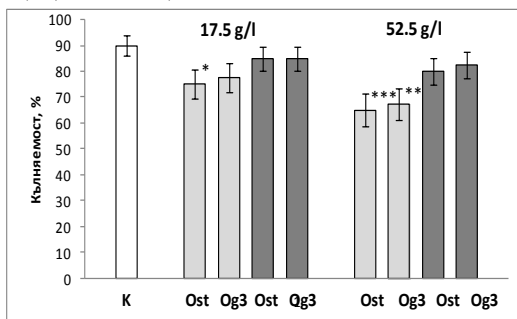
Другата причина е свързана с необходимостта от ограничаване на използването на пестициди в селското стопанство, което налага проучвания относно естествени биологично активни вещества, които да се използват за борба с вредителите. Лабораторните изследвания са първата стъпка в проучване на влиянието на фитотоксичните вещества. Поради наличието на данни за различен ефект на екстракти, получени

при различна температура (Ahn and Chung, 2000; Economou et al., 2007), ние тествахме влиянието на горещ и студен екстракт.

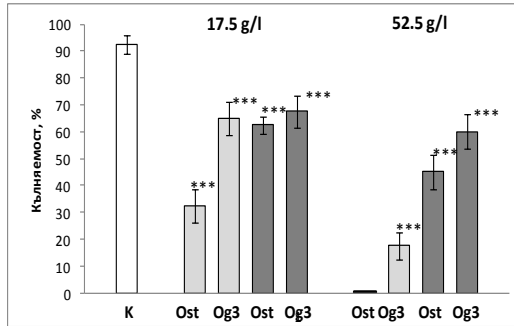
Както бе посочено в 2.2., четирите варианта от бял риган се различават по етеричномаслен състав. В предварителен експеримент ние установихме различен инхибиращ ефект върху кореновия растеж на семена от краставица. На базата на тези резултати избрахме да тестваме за алелопатия два от вариантите – с най-силен и най-слаб ефект, получени съответно от стъблени връхчата (Ost) и от кълнове от семена (Og3).

На **Фигура 1** са представени резултатите относно влиянието на горещите (ГЕ) и студените екстракти (СЕ) от бял риган върху покълнването на семена от *C. sativus* и *T. aestivum*. Студените екстракти и от двата варианта не оказват съществено влияние върху покълнването на семената от краставица (от 80.00% до 85.00% кълняемост). Само по-високата концентрация на горещите екстракти на двата тествани варианта бял риган – получените от стъблени връхчета (Ost) и получените от прорастъци от семена (Og3), потиска значително покълнването (около 65.00% кълняемост), (**Фиг. 1-А**).

Горещите екстракти от двата варианта риган значително потискат покълнването на семената от *T. aestivum*, като ефекта нараства при по-високите концентрации. Инхибиращият ефект е много по-силен при третиране с горещите екстракти от Ost (от 0% до 32.50% кълняемост) в сравнение с Og3 (от 17.50% до 65.00% кълняемост). Покълнването в студените екстракти също се потиска, но в по-ниска степен (от 45.50% до 67.50% кълняемост), (**Фиг. 1- В**).



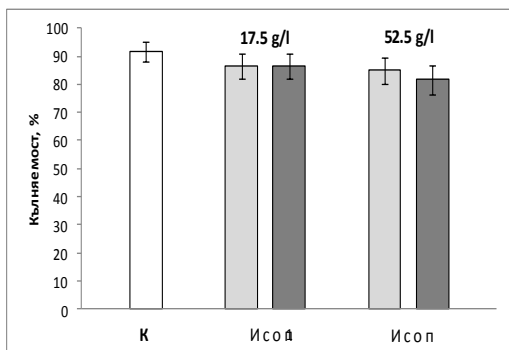
А



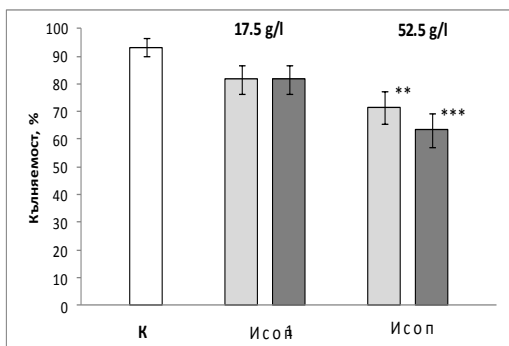
В

Фигура 1. Влияние на горещите и студени екстракти от микроразмножен бял риган, върху покълването на семена от *Cucumis sativus* L. (А) и *Triticum aestivum* L. (В). Варианти бял риган - Ost и Og3, концентрации – 17.5 g/l и 52.5 g/l; период на третиране 72 часа; К – контрола (дестилирана вода), □ – горещ екстракт, ■ – студен екстракт. Данните са представени като стойности $\pm m$ (стандартна грешка); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

На **Фигура 2** са представени резултатите относно влиянието на горещите и студени екстракти от исоп върху покълването на семена от краставица и пшеница. Семената и на двата тест-обекта имат около 90% кълняемост във вода за 3 дни. Кълняемостта при *C. sativus* не се повлиява съществено от нито един от екстрактите (кълняемост от 86.67% до 81.67%), (**Фиг.2- А**). Третирането с по-ниските концентрации на ГЕ и СЕ потиска кълняемостта при *T. aestivum* в същите граници (81.67% кълняемост). Инхибиращият ефект значително нараства при по-високата концентрация на ГЕ (71.67% кълняемост). Когато семената на *T. aestivum* покълват в СЕ в концентрация 52.5 g/l инхибирането е по-силно (63.33% кълняемост), (**Фиг. 2-В**).



А



В

Фигура 2. Влияние на горещите и студени екстракти от микроразмножен исоп върху покълването на семена от *Cucumis sativus* L. (А) и *Triticum aestivum* L. (В). Концентрации - 17.5 g/l и 52.5 g/l; период на третиране - 72 часа; К - контрола (дестилирана вода), □ – горещ екстракт, ■ – студен екстракт. Данните са представени като стойности $\pm m$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Както се вижда от представените резултати, риганът и в двата тествани варианта (Ost и Og3) потиска по-силно покълването на семената в сравнение с исоба. От двата използвани тест-обекта семената от пшеница показват по-голяма чувствителност към влиянието на водните екстракти.

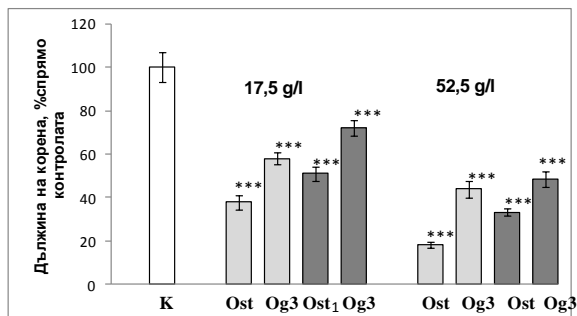
Наблюдаваният инхибиращ ефект при ригана съществено се увеличава при увеличаване на концентрацията.

При исоба подобен ефект, но проявен в много по-малка степен, се наблюдава само при семена от пшеница.

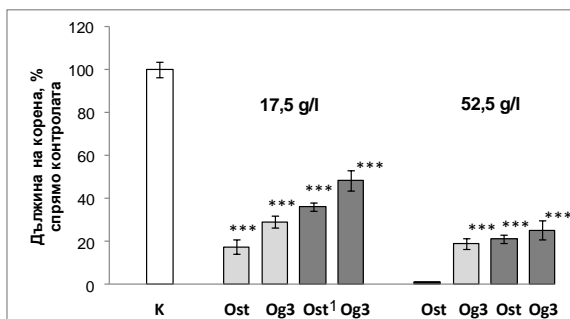
Различията в съдържанието на водоразтворимите вторични метаболити при двете растения се потвърждават и от данните относно различно влияние на екстракти, получени при различна температура. Докато при ригана по-голямо влияние има горещия екстракт, при исоба, в единственото третиране показало съществен ефект – върху пшеница, в по-високата концентрация, влиянието на студения екстракт е по-голямо.

3.2. Изследване на влиянието на водни екстракти от микроразмножени бял риган и исоп върху кореновия растеж на семена, покълнали във водните екстракти за 72 часа

Установено е, че алелохимикалите могат да инхибират покълването на семената и/или растежа на прорастъците (Kfuse et al., 2000). Поради това ние изследвахме влиянието на водните екстракти върху кореновия растеж на семена, покълнали във водните екстракти за 72 часа. На **Фигура 3** са представени резултатите относно влиянието на двата изследвани варианта риган (Ost и Og3). Дължината на корените и при двата тест-обекта, покълнали в екстрактите от Ost е значително редуцирана в сравнение с контролата. Кореновият растеж при *C. sativus* е инхибиран с 62.18% и с 49.07% при въздействие с по-ниските концентрации на Ost-ГЕ и Ost-СЕ. Инхибиращият ефект нараства при по-високите концентрации - 81.90% (Ost-ГЕ) и 66.97% (Ost-СЕ), (**Фиг. 3-А**). Инхибиращият ефект на по-ниската концентрация на Ost-ГЕ върху *T. aestivum* е много по-силен в сравнение с този при *C. sativus* – потискане от 82.73%. Третирането с по-високата концентрация на Ost-ГЕ напълно инхибира покълването. Инхибирането на кореновия растеж от Ost-СЕ също е по-силно в сравнение с това при *C. sativus* (**Фиг. 3-В**). Екстрактите от Og3 също имат инхибиращ ефект, но по-слаб от този на Ost (**Фиг. 3**). След въздействието на Og3-екстрактите ние наблюдаваме същите закономерности, като при Ost – инхибиращият ефект е по-силен при ГЕ в сравнение с СЕ и нараства при по-високата концентрация. Кореновият растеж при *T. aestivum* е по-силно потиснат от този при *C. sativus* (**Фиг. 3**).



A



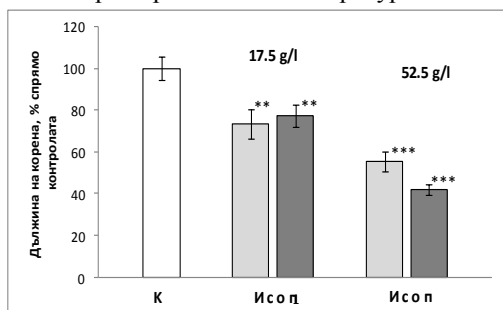
B

Фигура 3. Инхибиране на кореновия растеж на семена от *Cucumis sativus* L. (A) и *Triticum aestivum* L. (B), под влияние на горещи и студени екстракти бял риган. Варианти бял риган – Ost и Og3, концентрации – 17,5 g/l и 52,5 g/l; период на третиране – 72 ч.; K – контрола (дестилирана вода), □ – горещ екстракт, ■ – студен екстракт. Данните са представени като % спрямо контролата±m; *** P≤0.001

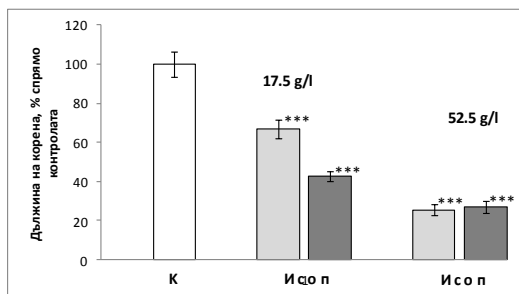
Дължината на корените и при двата тест-обекта, покъзнали в екстракти от исоп, е значително редуцирана в сравнение с контролата (Фиг. 4). Кореновият растеж при *C. sativus* е инхибиран с 26.73% и с 22.80% при третиране с пониските концентрации на ГЕ и СЕ. Инхибиращият ефект нараства при по-високите концентрации - 44.49% (ГЕ) и 58.10% (СЕ), (Фиг. 4-А). Потискането е по-силно при *T. aestivum* – инхибиране с 33.17% (ГЕ) и с 56.18% (СЕ), при въздействие на

по-ниските концентрации. При въздействието на по-високите концентрации на ГЕ и СЕ инхибирането на кореновия растеж е около 74.00% в сравнение с контролата (Фиг. 4-В).

Няма съществени различия между ефектите на екстрактите от исоп, получени при различни температури, върху кореновия растеж на *T. aestivum*. Кореновият растеж при *C. sativus* се инхибира по-силно от студения екстракт с концентрация от 52.5 g/l. Този екстракт също така инхибира най-силно и покълването на семената при двата тест-обекта. Този ефект може да се дължи на специфични химични съединения, които се инактивират при високи температури.



А



В

Фигура 4. Инхибиране на кореновия растеж при *Cucumis sativus* L.(А) и *Triticum aestivum* L. (В) под влияние на горещи и студени екстракти от исоп. Концентрации –17.5 g/l и 52.5 g/l; период на третиране 72 ч.; К – контрола (дестилирана вода), □ – горещ екстракт, ■ – студен екстракт. Данните са представени като % спрямо контролата±п; **P≤0.01, *** P≤0.001.

Установеното в 3.2 потискане на кореновия растеж от белия риган и исоба показва наличие на алелопатични вещества във водните екстракти.

Както се вижда от направения анализ, инхибиращият ефект на белия риган и исоба върху кореновия растеж е много по-силен в сравнение с ефекта върху кълняемостта на семената. Тези резултати потвърждават становището, че нарастването на корена е по-чувствително от покълването (Chung and Miller 1995). Според Nilsen et al. (1999) този ефект може да се дължи на бързото покълване на тестваните семена.

Наблюдаваната закономерност при покълването на семената – по-голям инхибиращ ефект на двете растения при *T. aestivum* отколкото при *C. sativus*, се потвърждава и от данните за влияние върху кореновия растеж. Това потвърждава наблюденията на Einhellig (1995), че растенията могат да реагират избирателно на въздействието на алелохимикалите.

Алелопатичното влияние на ригана е много по-голямо от това на исоба. Наличието на алелопатични вещества представлява интерес не само поради възможността за използване както на белия риган, така и на исоба (Jančokovský and Landa, 2002) в екологичното земеделие, поради евентуално повлияване на други култури (Nazir et al., 2007; Han et al., 2008). То насочва също така към по-нататъшни проучвания във връзка с разработването на биохербициди.

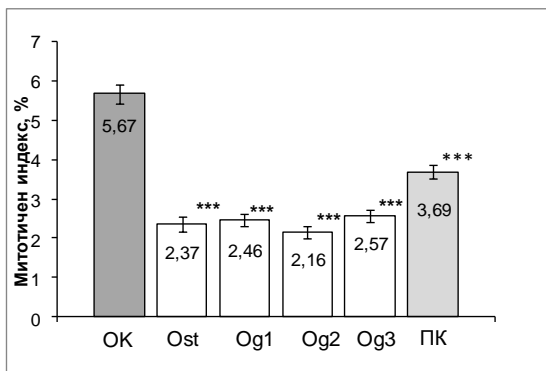
4. Изследване на влиянието на водни екстракти от бял риган и исоб върху дялящи се клетки

Въпреки че билковите лекарства се използват от векове от народите по целия свят, информацията относно тяхната биологична активност все още е непълна. Общоприето е, че билките са безвредни, защото са природни продукти. Изследвания през последните години обаче показват, че много от използваните в традиционната медицина растения имат *in vitro* и *in vivo* негативен ефект върху дялящи се клетки (Adegbite and Sanyaolu, 2009; Kura's et al., 2009; Çelik and Aslantürk, 2010; Sousa and Viccini, 2011; Borooh, 2011; Fatemeh and Khosro, 2012; Ghurde et al., 2012; Liman et al., 2012). Това ни мотивира за провеждането на настоящото изследване.

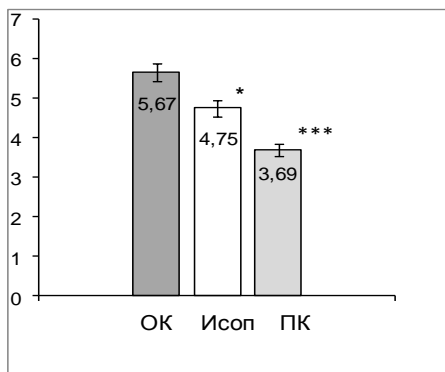
Доказан и традиционно използван в цитогенетичните изследвания е *Allium cepa* L.-теста, който показва висока чувствителност. Периодите на третиране и тестваните концентрации на екстрактите са определени въз основа на предварителни експерименти (данните не са представени). Тествани са две концентрации – препоръчваната в народната медицина (3.5 g/l), (Николова и Манолов, 2002) и пет пъти по-висока от нея (17.5 g/l) за два различни периода, съответно 3 ч. и 24 ч. Поради силно изразеният митодепресивен ефект на ригана, *Allium*-тестът е проведен с период на третиране 3 ч. и концентрация 3.5 g/l. В теста с исоп е изследван водния екстракт с концентрация 3.5 g/l за период от 24 ч., тъй като третирането за 3 ч. показва незначителен ефект.

4.1. Изследване на влиянието на водни екстракти от бял риган и исоп върху темпа на клетъчно делене на митотични клетки в корен от *Allium cepa* L.

Установихме, че под влияние на четирите тествани варианта бял риган (3.5 g/l, за 3 часа) стойността на митотичния индекс е понижена около два пъти в сравнение с отрицателната контрола (**Фиг. 5-А**). Под влияние на горещия екстракт от исоп (3.5 g/l, за 24 ч.) темпът на делене също намалява значително в сравнение с отрицателната контрола (**Фиг. 5-В**). Потискането на клетъчното делене е показател за цитотоксичен ефект (Leme and Marin-Morales, 2009; Samuel et al., 2010; Silva D.S.B.S., et al., 2011). Този негативен ефект е по-силно изразен при белият риган в сравнение с исоба.



А



В

Фигура 5. Влияние на третирането с водни екстракти (3.5 g/l) от микроразмножени бял риган (**А**) и исоп (**В**) върху митотичния индекс на меристемни клетки в корен от *Allium cepa* L. ОК – отрицателен контрола (дестилирана вода).; Ost, Og1, Og2, Og3 – микроразмножени растения бял риган; ПК – положителна контрола (метил метансулфонат, 11 mg/l). Време на третиране: бял риган – 3 ч., исоп – 24 ч., дестилирана вода – 24 ч., метил метансулфонат – 24 ч. Данните са представени като стойности $\pm \sigma$, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

Третирането с екстрактите от бял риган води до промени и в съотношението на фазите на митозата, изразено чрез по-висок процент клетки, намиращи се в профаза, в сравнение с контролата. Третирането с исоп също променя

съотношението на фазите на митозата, изразено главно чрез по-нисък процент на клетки, намиращи се в профаза, в сравнение с контролата. Промяната в съотношението на различните периоди на клетъчния цикъл също се приема като показател за цитотоксично влияние (Amin, 2002).

4.2. Изследване на влиянието на водни екстракти от бял риган и исоп върху честотата на митотични клетки с нарушения в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Много химични съединения, инхибиращи митотичната активност, също така индуцират и хромозомни аберации. Поради това в настоящата работа е изследвано влиянието на вариантите бял риган и на исоба върху честотата на митотични клетки с нарушения на генетичния материал.

В **Таблицы 8 и 9** са представени резултатите показващи влиянието на белия риган и исоба върху честотата на аберации в митотичните клетки. Данните показват индуцирането на висок процент на аномални митотични клетки при всички тествани екстракти.

Третирането с екстрактите от четирите варианта бял риган (3.5 g/l за 3 часа), значително увеличава честотата на хромозомните аберации в дялящите се клетки от коренов връх на *Allium cepa* L. (**Таблица 8**). Третирането с Ost увеличава хромозомните аберации – около 7 пъти в сравнение с контролата. Подобни са стойностите и при третиране с Og1, Og2 и Og3 индуцират почти два пъти по-малко аберации отколкото Ost. Третирането с исоп увеличава около три пъти процента на хромозомните аберации в дялящите се клетки в сравнение с контролата (**Таблица 9**).

Таблица 8. Влияние на третирането с водни екстракти (3.5 g/l) от четирите варианта микроразмножен бял риган в продължение на 3 ч. върху честотата на срещане на митотични клетки с нарушения.

Проба	Делящи се клетки (общ брой)	Общо нарушения % ($\pm\sigma$)
ОК	390	1.54 (± 0.12)
Ost	184	11.41*** (± 0.32)
Og1	210	9.05*** (± 0.29)
Og2	165	6.06* (± 0.24)
Og3	204	6.37** (± 0.24)
ПК	258	17.05*** (± 0.38)

Данните са представени като стойности $\pm \sigma$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; Проба: микроразмножени растения бял риган – Ost, Og1, Og2, Og3, ОК – отрицателен контрол (дестилирана вода); ПК – Положителен контрол (метил метансулфонат, 11 mg/l).

Таблица 9. Влияние на третирането с воден екстракт (3.5 g/l) от микроразмножен исоп в продължение на 24 ч. върху честотата на срещане на митотични клетки с нарушения.

Проба	Делящи се клетки (общ брой)	Общо нарушения в делящи се клетки, % ($\pm\sigma$)
ОК	390	1.54 (± 0.12)
Исоп	330	4.24* (± 0.20)
ПК	258	17.05*** (± 0.38)

Данните са представени като стойности $\pm \sigma$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ОК – отрицателен контрол (дестилирана вода); ПК – Положителен контрол (метил метансулфонат, 11 mg/l).

Белият риган и исопът индуцират различни видове хромозомни аберации. При третиране с бял риган най-често срещаните аберации са анафази и метафази с увреждане на делителното вретено, следвани от анафази и телофази със странстващи хромозоми. По-рядко се срещат анафази/телофази с фрагменти и мостове. При исоба с най-висока честота се срещат анафази и телофази с мостове и фрагменти, следвани от анафази със странстващи хромозоми. Установени са също така метафази с увреждане на делителното вретено, но с по-ниска честота.

Наличието на аномални метафази и странстващи хромозоми е показател за увреждане на делителното вретено (Rank, 2003) под влияние на ригана и исоба.

Често срещани аберации в нашето изследване са анафазите и телофазите с мостове и фрагменти. При разкъсване на ДНК краищата на хромозомите без теломери стават "лепливи" и могат да се обединят с други краища на хромозоми. Резултатите от тези хромозомни пренареждания са фрагменти и мостове, наблюдавани в дялящи се клетки от първия клетъчен цикъл сред третирането (Maluszynska and Juchimiuk, 2005).

Както се вижда от представените данни водните екстракти от бял риган след 3 часов период на третиране и водните екстракти от исоп след 24 часов период на третиране оказват влияние върху меристемни клетки от *Allium sera L.*, като индуцират нарушения с висока честота.

4.3. Изследване на влиянието на водни екстракти от бял риган и исоп върху честотата на аномални интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium sera L.*

Третирането с четирите варианта от бял риган значително увеличава процента на аномални интерфазни клетки (**Таблица 10**). Ost и Og1 индуцират по-висок процент клетки с микроядра в сравнение с Og2 и Og3. Подобна тенденция е наблюдавана и в честотата на двуядрените клетки.

Таблица 10. Влияние на третирането с водни екстракти (3.5 g/l) от четирите варианта микроразмножен бял риган в продължение на 3 ч. върху честотата на срещане на интерфазни клетки с нарушения.

Проба	Интерфазни клетки (общ брой)	Клетки с микроядра, % ($\pm\sigma$)	Клетки с две ядра, % ($\pm\sigma$)	Общо отклонения в интерфазни клетки, % ($\pm\sigma$)
ОК	6494	0.28 (± 0.05)	0.03 (± 0.02)	0.31 (± 0.06)
Ost	7579	1.58*** (± 0.12)	0.84*** (± 0.09)	2.43*** (± 0.15)
Og1	8335	1.36*** (± 0.12)	1.00*** (± 0.10)	2.35*** (± 0.15)
Og2	7490	0.97*** (± 0.10)	0.40*** (± 0.06)	1.38*** (± 0.12)
Og3	7721	0.96*** (± 0.10)	0.53*** (± 0.07)	1.49*** (± 0.12)
ПК	6733	0.48 (± 0.07)	0.23** (± 0.05)	0.71** (± 0.08)

Данните са представени като стойности $\pm \sigma$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; Проба: ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода); ПК – положителна контрола (метил метансулфонат, 11 mg/l); микроразмножени варианти бял риган – Ost, Og1, Og2, Og3.

Процентът на анормални интерфазни клетки също нараства значително след третирането с исоп (**Таблица 11**). Той индуцира по-висок процент двуядрени клетки в сравнение с контролата. Подобна тенденция е наблюдавана и при клетките с микроядра, но разликата с контролата не е съществена.

Таблица 11. Влияние на третирането с воден екстракт (3.5 g/l) от исоп в продължение на 24 ч. върху честотата на срещане на интерфазни клетки с нарушения в коренова меристема от *Allium sera* L.

Проба	Интерфазни клетки (общ брой)	Клетки с микроядра, % ($\pm\sigma$)	Клетки с две ядра, % ($\pm\sigma$)	Общо отклонения в интерфазни клетки, % ($\pm\sigma$)
ОК	6494	0.28 (± 0.05)	0.03 (± 0.02)	0.31 (± 0.06)
Исоп	6621	0.48 (± 0.07)	0.15* (± 0.04)	0.64** (± 0.08)
ПК	6733	0.48 (± 0.07)	0.23** (± 0.05)	0.71** (± 0.08)

Данните са представени като стойности $\pm \sigma$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ОК – отрицателен контрол (дестилирана вода); ПК – положителен контрол (менил метансулфонат, 11 mg/l).

Появата на микроядра е признак за разкъсване на хромозомите и нарушения в делителния апарат (Dash et al., 1988; Grover et al., 1999). Честотата на клетките с микроядра корелира с честотата на митозите с увреждане на делителното вретено, което показва, че микроядрата могат да бъдат добър показател за нарушена структура на делителното вретено. Нашите данни показват, че екстрактите от бял риган са силни инхибитори на делителното вретено. Наличието на двуядрени клетки показва, че екстрактите също така инхибират и цитокинезата.

Получените резултати показват, че негативното влияние върху клетъчното делене при *A. sera* е по-силно при белия риган отколкото при исоба. Съществуват различия между четирите тествани варианта бял риган – негативното влияние върху генетичния материал е по-силно при Ost и Og1 в сравнение с Og2 и Og3.

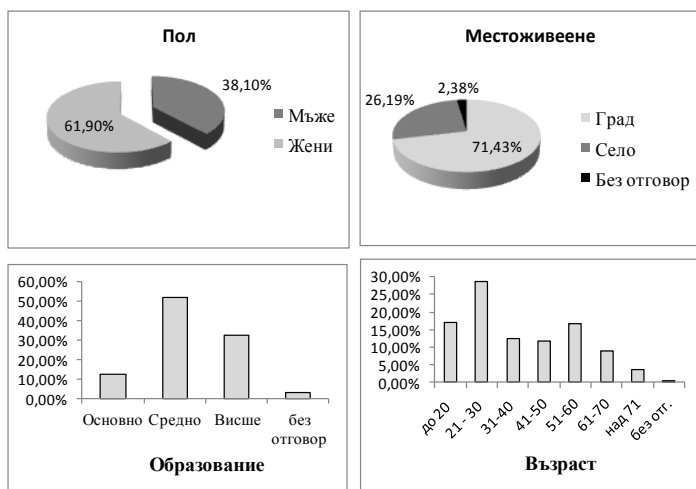
В повечето проучвания относно биологичната активност на етеричномаслените растения изследванията се фокусират върху характерните за тези растения етерични масла или отделни техни компоненти (Gomes-Carneiro et al., 2005; Azirak and Rencuzogullari, 2008; Mitić-Culafić et al., 2009; Sant'Anna et al., 2009; Stojanović-Radić et al., 2010). Представените в 4.2 и 4.3. резултати показват, че водните екстракти от изследваните от нас растения съдържат биологично активни вещества, които оказват съществен ефект върху дялящи се клетки. Необходимо е да се отбележи, че въпреки че разликите с отрицателната контрола по отношение на отчитаните в *A. serpa*-теста показатели при исоба са статистически достоверни, този ефект е много по-слабо проявен в сравнение с ригана.

В настоящата работа е установен митодепресивен ефект в дози, препоръчвани от народната медицина. В тези дози водните екстракти оказват влияние и върху генетичния материал. Двете растения оказват специфичен ефект – риганът уврежда предимно делителният апарат, а исобът индуцира хромозомни аберации с разкъсване на хромозомите. Установено е, че *A. serpa*-тестът показва добра корелация с други еукариотни тест-системи (Fiskesjö, 1985; Fiskesjö, 1993; Rank et al., 1993; Ghosh et al., 2010), поради което получените резултати могат да служат като сигнал за потенциално негативно влияние и върху човека.

От друга страна, наблюдаваните ефекти върху дялящи се клетки допринасят за изясняване на алелопатичния ефект на тестваните растения. Една от основните задачи на алелопатичните изследвания е изясняване на механизма на действие на алелохимикалите, тъй като видимите прояви на алелопатията са следствие на първични ефекти, осъществявани на клетъчно или молекулно равнище (Драгоева, 2007). Изследванията в тази област показват, че много алелохимикали оказват влияние върху клетъчната репродукция.

5. Резултати от анкетното проучване относно използване на лечебни растения от сем. Lamiaceae

Етноботаниката има важна роля за съхранение на традиционните знания за лечебните растения. В съвременното общество глобализацията и миграцията водят до загуба на тези знания. Един от подходите за събиране на данни в етноботаниката са интервютата с населението. В настоящото изследване е проведено анкетно проучване в различни райони на България относно използването на лечебни растения от сем. Lamiaceae. Интервюирани са 210 души. Демографските характеристики на респондентите са представени на **Фигура 6**. Отговорите на въпросите от анкетата, представляващи интерес за целите на дисертационния труд, са представени в **Таблица 12**.



Фигура 6. Демографски профил на респондентите.

Таблица 12. Отговори на респондентите на поставените въпроси.

Въпроси	Отговори	n (%)
Смятате ли, че билките са полезни за вашето здраве	Да	201 (95.71%)
	Не	3 (1.43%)
От къде намирате билките	Събирам ги сам	28 (13.33%)
	Купувам ги	85 (40.48%)
	Събирам ги сам или ги купувам	94 (44.76%)
Билките имат ли странични ефекти	Да	132 (62.86%)
	Не	57 (27.14%)
	Не знам	19 (9.05%)
Безопасни ли са дозите препоръчвани в народната медицина	Да	144 (68.57%)
	Не	32 (15.24%)
	Не знам	29 (13.81%)
Използвате ли риган	Да	112 (53.33%)
	Не	91 (43.33%)
Използвате ли исоп	Да	5 (2.38%)
	Не	196 (93.33%)

n – брой; Процентът е различен от 100.00% защото някои от респондентите не са отговорили.

Както се вижда от данните в **Таблица 12**, 95.71% от респондентите смятат, че билките са полезни за здравето. Известно е, че в България съществуват вековни традиции в

използването на лечебни растения (Nedelcheva, 2012). Нашите резултати показват, че тези традиции са запазени и до днес.

Българската флора е богата на лечебни растения, но поради прекомерна употреба и неправилно събиране естествените находища на много от тях са застрашени от изчезване. Поради това интерес представлява начинът, по който хората си осигуряват билки. Резултатите от проучването показват, че само малък процент (13.33%) от респондентите се снабдяват с билки, като ги събират сами (**Табл. 12**). Голям дял от респондентите купуват билките – 40.48%, или освен че събират билки ги осигуряват и чрез търговската мрежа – 44.76%. Както е известно, събирането на лечебни растения изисква знания за тяхното разпознаване. Вероятна причина повече от анкетираните, които желаят да използват билки, да разчитат на закупуването им е загубата тези традиционни знания. Събирането на билки в промишлени количества, които да се предлагат в търговската мрежа в нативно състояние или преработени във фармацевтична форма, налага съответна регулация, за да се запазят естествените находища. Това потвърждава и необходимостта от култивирането на тези растения в селското стопанство, за да бъдат съхранени природните популации (Генова, 1995; Ганчев, 1995).

Едно от направленията на съвременната етноботаника е изследване на страничните ефекти на лечебните растения (Gilani and Atta-ur-Rahman, 2005; Pawlus and Kinghorn, 2007). Както се вижда от данните в **Таблица 12**, голям дял от анкетираните (62.86%) знаят, че билките имат странични ефекти. В същото време на въпроса дали дозите препоръчвани в народната медицина са безопасни утвърдително са отговорили 68.57% от респондентите. Това означава, че повечето от анкетираните се доверяват на традиционните знания за билките. Установено е, обаче, че билковите препарати са сложна смес от биологичноактивни вещества, които могат да имат различни ефекти върху човешкия организъм (Наq, 2004; George, 2011). Поради това е необходимо да се проучат тези ефекти, за да се осигури сравнително безопасното им използване от населението.

За целите на дисертационния труд интерес представлява доколко двете проучвани растения – риган и исоп, са познати и

използвани в България. Както се вижда от **Таблица 12**, риган използват 53.33% от анкетиранияте, а само 2,38% използват исоп. Ниският дял на респондентите използващи исоп е очакван, тъй като населението обикновено употребява широко разпространени растения. Тези данни потвърждават необходимостта от култивиране на лечебни растения с ценни качества, за да се осигури достъп на населението до тях.

Обект на по-нататъшен анализ в нашето изследване е установяване на взаимоотношенията между демографския профил на респондентите и отговорите, които дават на въпросите. За да се установи корелацията между тези показатели беше използван коефициента на взаимосвързаност на Пирсън.

Резултатите от анализа показват, че значително влияние върху отговора на въпроса от къде намират билки оказва възрастта ($r=0.67$) (**Табл. 13**). Най-голям е дялът на анкетиранияте, които си набавят билките сами, в две възрастови групи: над 71 г. (50.00%) и от 61 до 70 г. (36.84%). Това са предимно хора навлизащи в пенсионна възраст и/или вече пенсионирани. Те разполагат с повече свободно време и могат сами да си набавят лечебни растения. Най-висок е процентът на купуващи билки във възрастовата група от 31 до 40 г. (57.69%). Възможно обяснение е, че това са хора в трудоспособна възраст и вероятно нямат време сами да събират лечебни растения. Друга вероятна причина по-младите да предпочитат закупуването на билки е липсата на практически умения за разпознаване на лечебните растения.

Умерено влияние върху отговора ($r=0.49$) оказва мястото, където анкетиранияте са живяли най-дълго. По-висок процент на събиращи сами билки има сред живеещите на село – 32.73%, докато при градското население този процент е по-нисък – 6.67%. При живеещите в град най-голям дял от хората си набавят билки чрез закупуване – 47.33%. Тези данни са очаквани, тъй като живеещите в малки населени места са в по-близък контакт с природата, отколкото градското население.

Таблица 13. Влияние на демографския профил върху отговорите на въпроса „От къде намирате билки“.

	Демографски показатели	Събирам ги сам	Купувам ги	Събирам ги или ги купувам
		n (%)	n (%)	n (%)
Пол	Жени (n:130)	16 (12.31)	56 (43.08)	57 (43.85)
	Мъже (n:80)	12 (15.00)	29 (36.25)	37 (46.25)
		<i>P>0.05</i>		<i>r=0.14^a</i>
Възраст	До 20 г. (n:36)	2 (5.56)	14 (38.89)	20 (55.56)
	От 21 до 30 г. (n:60)	7 (11.67)	30 (50.00)	23 (38.33)
	От 31 до 40 г. (n:26)	1(3.85)	15 (57.69)	10 (38.46)
	От 41 до 50 г. (n:25)	3 (12.00)	10 (40.00)	11 (44.00)
	От 51 до 60 г. (n:35)	4 (11.43)	8 (22.86)	22 (62.86)
	От 61 до 70 г. (n:19)	7 (36.84)	7 (36.84)	5 (26.32)
	Над 71 г. (n:8)	4 (50.00)	1 (12.50)	3 (37.50)
		<i>P<0.05</i>		<i>r=0.67^c</i>
Образование	Основно (n:2)	8 (30.77)	8 (30.77)	10 (38.46)
	Средно (n:109)	12 (11.01)	45 (41.28)	52 (47.71)
	Висше (n:68)	6 (8.82)	31 (45.59)	29 (42.65)
		<i>P<0.05</i>		<i>r=0.36^b</i>
Местоживее	Град (n:150)	10 (6.67)	71 (47.33)	67 (44.67)
	Село (n:55)	18 (32.73)	13 (23.64)	24 (43.64)
		<i>P<0.05</i>		<i>r=0.49^b</i>

n – брой; P<0.05 – разликите са статистически достоверни, P>0.05 – няма статистическа достоверност; r – корелационен коефициент на Пирсън: a - слаба корелация, b - умерена корелация, c - значителна

корелация. Процентът е различен от 100.00% защото някои от респондентите не са отговорили.

Резултатите от проведената анкета показват, че традициите за използване на лечебни растения в България са запазени и до днес. Според направеното анкетно проучване риган използват голям дял от анкетираните, а исоп – само 2.38%. Ниският дял на респондентите използващи исоп е очакван, тъй като населението обикновено употребява широко разпространени и популярни растения. Това потвърждава необходимостта от култивиране на лечебни растения с ценни качества, за да се осигури достъп на населението до тях.

ИЗВОДИ

Получените резултати позволяват да се направат следните изводи:

1. Установени са оптимални хранителни среди за инициране на *in vitro* култури от бял риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) и исоп (*Hyssopus officinalis* L.) като най-ефективна за микроразмножаването на белия риган е комбинацията БАП (1 mg/l)/ НОК (0.01 mg/l), а за исоба – БИ (0.5 mg/l) или ПП-40 (0.5 mg/l) самостоятелно.
2. Определени са оптимални комбинации и концентрации от растежни регулатори за *in vitro* вкореняване на бял риган и исоп. Установена е зависимост между вида на експланта и *in vitro* отговора на растенията бял риган; по-лесно се вкореняват растенията, получени от стъблени връхчета, отколкото тези, произлезли от прорастъци от семена.
3. Според етеричномасления състав микроразмножените растения бял риган са от карвакролов хемотип. Установени са различия в състава на етеричните масла и в биометричните показатели на четирите варианта, получени от едно майчино растение и отглеждани при еднакви условия, което предполага генетична хетерогенност на изследваните варианти.

4. Установен е аделопатичен ефект на водни екстракти от бял риган и исоп върху изследваните тест-обекти като ефектът на белия риган е по-силен в сравнение с исоба.
5. В лабораторни условия водните екстракти от бял риган и исоп оказват по-силно влияние върху кореновия растеж, отколкото върху покълването на семената. Потискащият растежа ефект е по-силен при *Triticum aestivum* L. (едноседелно растение), отколкото при *Cucumis sativus* L. (двуседелно растение).
6. Установена е зависимост между инхибиращия ефект на водните екстракти от бял риган и температурата при която са получени: горещите екстракти имат по-силен инхибиращ ефект върху кълняемостта на семената и върху кореновия растеж в сравнение със студените. При исоба подобна закономерност не се наблюдава.
7. Установено е, че екстракти от бял риган (3.5 g/l за 3 ч.) и исоп (3.5 g/l за 24 ч.) понижават интензитета на клетъчното делене, променят съотношението на фазите на митозата и предизвикват нарушения в митотични и интерфазни клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L., факт, който предполага наличие на цитотоксично влияние.
8. Установен е специфичен цитотоксичен ефект на екстрактите от двата изследвани растителни вида върху коренова меристема на *A. cepa* L.: белият риган индуцира предимно увреждания на делителния апарат, а исопът – различни хромозомни аберации с разкъсване на хромозомите.
9. Проведеното анкетно проучване относно използването на лечебни растения показва убеденост на 96% от анкетиранияте, че билките са полезни за здравето, като е налице и добра информираност на преобладаващата част от анкетиранияте, относно страничните ефекти на лечебните растения. Според анкетното проучване, исопът е почти непознат в България, което потвърждава необходимостта от култивиране на редки лечебни растения с ценни качества.

ПРИНОСИ

1. За пръв път в България са разработени ефективни протоколи за микроразмножаване на бял риган и исоп, които осигуряват качествен растителен материал за селекционни и производствени цели. Създадено е експериментално насаждане от *in vitro* размножените растения на територията на Земеделски институт – Шумен.
2. Доказано е наличие на алелопатични вещества във водни екстракти от бял риган и исоп, което земеделските производители трябва да имат предвид при включване на тези растения в земеделските практики.
3. За пръв път е установено, че водните екстракти от бял риган и исоп имат негативно влияние върхуделящи се клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. Това допълва информацията относно биологичната активност на тези лечебни растения с цел тяхното безопасно използване.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

I. Публикации в периодични научни списания:

1. Nanova, Zh., Y. Slavova, 2006. Mass vegetative propagation of winter marjoram (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Jetswaart), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12:531-536.
2. Dragoeva, A., Zh. Nanova, V. Kalcheva, 2008. Allelopathic activity of micropropagated *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* and its effect on mitotic activity, *Allelopathy Journal*, 22(1):131-142. (**IF – 0.68 за 2008 г.**)

II. Публикации в сборници:

3. Нанова, Ж., 2007. Биометрични показатели и стеричномаслен състав на бял риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Jetswaart) от култура. Научна конференция с международно участие „Природни науки – 2006”, Годишник на ШУ „Епископ К. Преславски”, том XVII ВЗ, ISSN: 1311-834X, 111-119.

III. Участие в научни форуми

4. Димитрова, Ж., И. Йотова, М. Касчиева, П. Колева, 2013. Приложение на *in vitro* размножаването при лечебни растения. Студентска научна конференция „Екология и околна среда”, Шуменски университет, Шумен, 01.03.2013. Сборник с резюмета, ISBN 978-954-577-668-7, с. 16-17.

Забелязани цитирания:

Dragoeva A., Zh. Nanova, V. Kalcheva. Allelopathic activity of micropropagated Origanum vulgare ssp. hirtum and its effect on mitotic activity. Allelopathy Journal, 22(1): 131-142, 2008. (IF – 0.68)

Цитирано в:

1. Танова, К., И. Учкунов, В. Будаева. Экологическое применение эфирного масла лаванды для подавления возбудителя гнили сахарной свеклы *Rhizoctonia solanii* Kuhn. Материалы IV Всероссийской научной конференции. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Барнаул-2009, 258-260.

2. Sushama Devi C. K. Spices Bibliography-2008 (Part I). 2009. Journal of Spices and Aromatic Crops Vol. 18 (1) : 43–70.
3. Cavalieri, A.; F. Caporali. 2010. Effects of essential oils of cinnamon, lavender and peppermint on germination of Mediterranean weeds. *Allelopathy J.*, 25(2):441-452. **(IF 0.635)**
4. Sousa, Saulo M.; Silva, Pâmela S. And Viccini, Lyderson F. 2010. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 82:(2), 305-311. **(IF 1.201)**
5. Verdeguer Sancho, Mercedes María. Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis doctoral Valencia, junio de 2011, Universitat Politècnica de València. Departamento de Ecosistemas Agroforestales - Departament d'Ecosistemes Agroforestals.
6. Botelho C. M., M.M. Praça Fontes, M. J.Palmieri, B. G. Laviola, L. F.Andrade Vieira. 2011. EFEITO DO ÓLEO DE PINHÃO - MANSO (*Jatropha curcas*) NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR DE *Lactuca sativa*. XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba.
7. Ghayal, Nivedita A. 19-Apr-2012. Studies on allelopathic potential and biochemical characterization of *cassia uniflora* and *synedrella nodiflora*, the dominant invasive weeds from the campus of Pune Universit. Thesis submitted to UNIVERSITY OF PUNE PUNE- 411 007. For the degree of Doctor of Philosophy.

Благодарности

Изказвам най-искрени благодарности на моят научен консултант проф. д-р Венета Капчина – Тотева за неоценимата помощ и подкрепа, която ми оказа при разработването и оформянето на дисертационния труд!

Сърдечно благодаря на доц. д-р Ася Драгоева и гл.ас. д-р Ваня Колева, с чиято помощ и подкрепа е свързано разработването на настоящата дисертация!

*Изказвам дълбока благодарност на доц. д-р Йорданка Славова и на работещите в лабораторията по тъканни култури на Земеделски институт – Шумен за неоценимата помощ при въвеждането на растенията в култура *in vitro*!*

Благодаря на всички колеги от катедра Физиология на растенията при Биологически факултет на СУ “Св. Климент Охридски” и от Факултета по природни науки на ШУ “Епископ Константин Преславски” за съветите и помощта при разработването на настоящата дисертация!