

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО БОТАНИКА



---

Мирослава Андреева Стефанова

**СРАВНИТЕЛНО СТРУКТУРНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА  
ЛИСТ ПРИ *IN VITRO* КУЛТИВИРАНИ ЛЕЧЕБНИ  
РАСТЕНИЯ ОТ СЕМ. LAMIACEAE**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

**ДОКТОР**

Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(*Ботаника-Анатомия и морфология на растенията*)

София, 2013 г.

Дисертантът е асистент в Катедрата по ботаника при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски". Зачислен е в свободна докторантура към Катедрата по ботаника със Заповед № РД 20-841/06.07.2012 г.

Изследванията по дисертацията са извършени в Лабораторията по анатомия и морфология на растенията при Катедрата по ботаника на Биологически факултет в периода март 2009 г. – май 2012 г. Изследванията по дисертацията са финансирани от проект на МОМН - ДТК 02/09/2009 "Морфолого-функционален статус и създаване на информационна система за *in vitro* култивираното лечебно растение *Lamium album* L."

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО БОТАНИКА

---

Мирослава Андреева Стефанова

**СРАВНИТЕЛНО СТРУКТУРНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛИСТ ПРИ  
*IN VITRO* КУЛТИВИРАНИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ  
ОТ СЕМ. LAMIACEAE**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

**ДОКТОР**

Професионално направление *4.3. Биологични науки*  
(*Ботаника-Анатомия и морфология на растенията*)

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Димитрина Колева

**Научно жури**

Председател:

Проф. д-р Майя Стойнева

Членове:

Доц. д-р Димитрина Колева

Доц. д-р Елена Чакалова

Доц. д-р Анна Ганева

Доц. д-р Марина Станилова

София, 2013 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Съвета на Катедрата по ботаника при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски", състоял се на 20.05.2013 г.

Дисертационният труд съдържа 139 страници, 94 светлинномикроскопски и 27 електронномикроскопски снимки, подредени в 24 табла, и 3 таблици. Библиографската справка включва 172 заглавия, от които 7 на кирилица и 165 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....  
2013 г. от ..... ч. в ..... зала на БФ.

## УВОД

Съвременните биотехнологични методи предоставят огромни възможности за размножаване и дългосрочно съхранение на ценни растителни видове. Микроразмножаването е вегетативно размножаване на растенията в *in vitro* условия, което осигурява бързо получаване на голямо количество растителен материал, съхраняващ генетичния потенциал на изходните растения. За много растителни видове са разработени успешни процедури за микроразмножаване, но все още няма универсален протокол, приложим за всеки вид. Ефективността на този метод зависи както от качествата на експланта, така и от условията на *in vitro* култивиране. Получените в лабораторни условия растения се нуждаят от период на аклиматизация преди да бъдат прехвърлени в *ex vitro* или *in vivo* условия. При много растителни видове възникват проблеми в процеса на закаляване, водещи до значителни загуби на растителен материал. Това се дължи на факта, че в *in vitro* условия регенерантите формират специфичен фенотип, който затруднява аклиматизацията им *ex vitro*.

Морфогенезата на растенията, отгледани в лабораторни условия, може да бъде манипулирана чрез контролиране на *in vitro* условията с цел да се получат растения, чиито структурни характеристики и физиологични показатели да улеснят преминаването им през всички етапи на микроразмножаването. В процеса на *in vitro* култивиране фактори със значим ефект върху регенерацията на растенията са добавените в средата растежни регулатори. Чрез тях може да се компенсира нарушения фитохормонален баланс на експлантите и да се контролират морфогенетичния отговор и хистологичните особености на регенерантите. Необходимостта от използването на растежни регулатори при микроразмножаването е безспорна, но липсата на конкретна информация за действието им върху структурната организация на *in vitro* растенията води понякога дори до неефективното им приложение. Най-често преценка на качествата на регенерантите се прави чрез оценка на параметрите на размножителния коефициент, а в някои

случаи дори емпирично. Резултати от изследването на структурната организация на новообразувания лист дават научен подход за оценка на регенерационния потенциал на експлантите и за влиянието на условията на култивиране при осъществяването му. При *in vitro* култивирането подходът към всеки вид трябва да бъде индивидуален. Познаването на структурните особености на субклетъчно, клетъчно и тъканно ниво позволява да се направи оценка на подходящите за всеки конкретен вид *in vitro* условия и да се прогнозира процесите на *ex vitro* адаптация и аклиматизация на микроразмножените растения.

Обект на настоящото изследване са три вида лечебни растения от сем. *Lamiaceae* Lindley, регенерирани в *in vitro* условия, при които въпросът за аклиматизацията им остава открит.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Целта на дисертационната работа е да се изследва структурната организация на листа при *in vitro* култивирани растения от *Lamium album* L., *Leonurus cardiaca* L. и *Orthosiphon stamineus* Benth. и да се установи влиянието на растежните регулатори бензиладенин (БА) и индолмаслена киселина (ИМК) върху структурирането на тъканите, клетките и пластидния апарат при регенерацията на растенията, както и да се отговори на въпроса дали резултатите от едно структурно изследване са достатъчно информативни за осигуряване на успешно *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптация на всеки вид.

За изпълнение на поставената цел бяха набелязани следните задачи:

1. Сравнително анатомично изследване на листа при *in vitro* растения, култивирани в основна хранителна среда и в среда с добавени растежни регулатори и хистологичен анализ на влиянието на БА и ИМК върху листната архитектура. Морфометричен анализ на анатомичните показатели като количествен критерий за оценка на въздействие на растежните регулатори.

2. Ултраструктурно изследване на хлоропласти при *in vitro* растения, култивирани в основна хранителна среда и в среда с добавени растежни регулатори, и сравнителен анализ на влиянието на растежните регулатори върху формирането на пластидния апарат.

3. Сравнителен анализ на всички получени структурни резултати на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво при *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus*.

### **ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД**

В този раздел са разгледани и анализирани структурно-функционални изследвания върху фотосинтетичния апарат на микроразмножени растения и растения при други експериментални условия за периода от 1965г. до 2013г. Чрез резултатите от тях се обосновава необходимостта от прилагането на структурен подход при изследванията на *in vitro* култивирани растения за оценка на регенерационния потенциал на видовете в лабораторни условия. Представени са изследвания, които разглеждат биологичната роля на най-използваните при микроразмножаване на растенията растежни регулатори – цитокинините и ауксините. Обръща се внимание на необходимостта от изясняване на ролята на растежните регулатори при *in vitro* регенерацията на листа като основен орган на фотосинтезата и се акцентира върху изследвания, които анализират действието на растежните регулатори върху структурните характеристики на *in vitro* растенията на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво на организация. Представени са работи, които чрез светлинна и трансмисионна електронна микроскопия характеризират структурните особености на листата, дължащи се на прилагането на растежни регулатори в процеса на култивиране. Специално внимание се обръща на изследвания, в които растежните регулатори успешно се прилагат за модификация на морфогенетичния потенциал на листната тъкан в посока на увеличаване на ефективността на регенерацията на растенията *in vitro* и улесняване на аклиматизацията *ex vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

**Експериментален растителен материал:** Изходният експериментален материал от *L. album* и *L. cardiaca* е събран от популации на вида, намиращи се в Лозенска планина. Ваучерни образци с номера съответно SO-105183, SO-105806 са депозирани в хербариума на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Изходният материал от *O. stamineus* произхожда от интродуцирани в България растения, обект на съвместно изследване на Пловдивски университет и Ботанически институт – БАН (Киряков *et al.* 2001). Ваучерен образец, събран от *ex vitro* адаптирано растение, е депозирани в хербариума на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ под номер SO-107528.

Растителният материал е въведен и изпитван в *in vitro* култура от научен колектив в Лабораторията по растителни биотехнологии към катедра „Физиология на растенията“ при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Получените от всеки вид изходни растения са микроразмножени и поддържани на стандартна MS хранителна среда (Murashige and Skoog 1962) с добавени 0,3% захароза и 0,8% агар. Растенията са отглеждани в затворени лабораторни съдове в култивационно помещение при контролирани условия: температура 22°C, 16-часов фотопериод ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  плътност на фотосинтетичния фотонен поток, бяла флуоресцентна светлина, лампи Phillips TL-D33) и относителна влажност на въздуха 60-70% (Dimitrova *et al.* 2009; Dimitrova *et al.* 2010; Dimitrova *et al.* 2012).

В етапа на мултипликация от протокола за микроразмножаване стъблени експланти (възел с част от прилежащите междувъзлия) от трите вида са култивирани на стандартна MS хранителна среда с добавени растежни регулатори N<sup>6</sup>-бензиладенин (БА) и индол-3-маслена киселина (ИМК) в посочените по-долу концентрации самостоятелно и комбинирано:



Вид	БА(мг/л)	ИМК(мг/л)	БА+ИМК(мг/л)	БА+ИМК(мг/л)
<i>L. album</i>	0,2	0,5	0,2 + 0,5	0,2 + 0,05
<i>L. cardiaca</i>	0,3	0,4	0,3 + 0,4	0,3 + 0,04
<i>O. stamineus</i>	0,1	0,9	0,1 + 0,9	0,1 + 0,09

За всеки вид тези концентрации са определени индивидуално като оптимални след предварителни скринингови изследвания, проведени в Лабораторията по растителни биотехнологии. При трите вида е изследвано влиянието на БА, ИМК и техните комбинации в концентрационен градиент (от 0,1 до 1,0 мг/л) върху някои физиологични и биохимични показатели. Предварителното изследване включва измерване на основните параметри на размножителния коефициент при *in vitro* култивираните растения (брой и дължина на страничните разклонения, свежо и сухо тегло на регенерантите, брой и дължина на корените, калусообразуване, степен на свръххидратация), както и продукцията, състав и действие на основни вторични метаболити в *in vitro* регенерираните растения (Dimitrova *et al.* 2009; Dimitrova *et al.* 2010; Valyova *et al.* 2011; Dimitrova *et al.* 2012; Kapchina-Toteva *et al.* 2013 (непубликувани данни)). За целите на структурното изследване от всеки вариант на третиране са заложили по 10 експланта в три повторения. Паралелно са заложили експланти на стандартна MS хранителна среда без добавяне на растежни регулатори и получените регенеранти в условията на експеримента са контролен вариант. Експерименталните растения са отглеждани в стерилни условия в култивационно помещение при посочените по-горе параметри. Структурните изследвания са проведени върху новоформирани листа на растения, получени след 5-седмично култивиране.

**Светлинна микроскопия:** Светлинномикроскопски са изследвани новоформирани напълно диференцирани листа от втори и трети възел на стъблата на *in vitro* регенерираните растения. За характеризиране на анатомичното устройство и измерване на анатомичните показатели на

листата листни сегменти, изрязани от средната част на петурата отстрани на централната жилка, са фиксирани в 3% глутаралдехид (m/v) (pH 7,4). Пробите за фиксиране са взети от пет растения за всеки вариант. Материалът е нарязан на ръка и пререзите са включени в полутрайни микроскопски препарати за хистологичен и морфометричен анализ. Направен е хистологичен анализ на фотосинтезиращия паренхим и на епидермалните тъкани чрез метода на светлинната микроскопия. При всички изследвани варианти измерваните морфометрични показатели са дебелина на листната петура, на асимилационния паренхим, на палисадната и гъбчестата тъкани, на абаксиалната и адаксиалната епидерми. Всеки един от показателите е определен въз основа на 15 измервания в трикратна повторяемост. Изчислен е коефициентът на палисадност за всеки един от вариантите на експеримента. Определен е и средният брой устица при двете епидерми на 15 случайно избрани микроскопски полета за всеки лист в трикратна повторяемост. Получените стойности за измерените белези са подложени на статистическа обработка (софтуер SigmaStat. 3.5.). Изчислени са средната аритметична стойност и стойността на стандартното отклонение. Количествените данни при различните варианти са подложени на тест за нормалност на разпределението (One Way ANOVA). Сравняването на вариантите по изследваните белези е направено с помощта на рангов дисперсионен анализ (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks). При установени статистически достоверни разлики в получените стойности за всеки показател е направено сравнение на вариантите по двойки (All Pairwise Multiple Comparison Procedures) с Tukey Test или Holm-Sidak method. Получените статистически данни са отразени в таблиците. Наблюдението и измерванията са направени на микроскоп Amplival 4 (Carl Zeiss, Йена, Германия), а светлинномикроскопските снимки - на микроскоп и камера Nikon Eclipse 50i (Токио, Япония). Резултатите от светлинномикроскопското изследване са представени на 17 табла, включващи 94 микрофотографии и в 3 таблици.

### **Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ):**

Трансмисионната електронна микроскопия е метод, който се основава на двойна фиксация на растителния материал, дехидратация и включване в смола. За ТЕМ-анализ е взет листен материал от втора и трета двойка новообразувани и напълно диференцирани листа от пет регенерирани растения за всеки вариант (материалът е идентичен с изследвания чрез светлинномикроскопски метод). Листни сегменти с големина около 1 мм<sup>2</sup>, отрязани от средната част на петурата между по-големите жилки, са фиксирани в 3% глутаралдехид (m/v) в 0,1 М фосфатен буфер (рН 7,4) за 12 часа при 4°C. Постфиксацията е направена с 2% воден разтвор на КМnO<sub>4</sub> за 2 часа при стайна температура. След двойната фиксация растителният материал е промит във фосфатен буфер и дехидратиран във възходящ градиент от концентрации на етилов алкохол и ацетон както следва: етанол 30% (15 мин.), етанол 50% (15 мин.), етанол 75% (15 мин. или 1 нощ), етанол 85% (15 мин.), етанол 95% (15 мин.), етанол 100% (двукратно по 15 мин.), етанол 100%:ацетон (равни части) (15 мин.) и ацетон (30 мин.). Като включваща среда бе използван Durcupan (Fluka, Бухс, Швейцария). За по-добро пропиване на тъканите със смолата листните сегменти са третираны последователно с ацетон и смола в съотношения 9:3, 7:3 и 1:1 за един час във всяка степен и са прехвърлени в капсули с чиста смола за полимеризация при 37°C за 24 часа и 60°C за 48 часа. Включеният материал е нарязан на ултрамикротом Reichert (Виена, Австрия) и е допълнително контрастиран с оловен цитрат при рН 12 по метода на Reynolds (1963). Наблюдението, както и документирането на резултатите, са направени на трансмисионен електронен микроскоп JEOL 1200 EX (Токио, Япония). Резултатите от ТЕМ-анализа са представени на 7 табла с 27 електронограми.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Сравнителният анализ на всички структурни резултати на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво на организация при листа от *in vitro* култивирани растения от *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus* дава възможност получените данни да се използват за оптимизиране на протокола за микроразмножаване на всеки един от изследваните видове. Информацията, която получихме от хистологичното изследване и изследването на хлоропластната ултраструктура при трите вида лечебни растения, използвани като моделни обекти, е необходима и достатъчна за оценка на регенерационния им потенциал *in vitro* и в етапа на *ex vitro* адаптацията при условията на експеримента. В настоящото изследване бяха установени всички необходими структурни маркери, които при условията на експеримента показват универсалните и специфичните структурни характеристики на лист, формиран в *in vitro* условия, както и необходими ли са растежните регулатори БА и ИМК и как да бъдат прилагани при култивирани от нас видове.

**Хистологичният анализ** на новообразувани листа при *in vitro* растенията от трите изследвани вида показва, че при култивиране на **основна MS хранителна среда** (контролни растения) се формира типичен бифациален лист със същата архитектура като при *in vivo* растенията, но с по-малка дебелината на петурата (Фиг. 1, 2, 3). Формирането на листна петура с по-малка средна дебелина се приема за универсална характеристика на *in vitro* култивирани растения (Zobayed *et al.* 1999; Picoli *et al.* 2001; Mayer *et al.* 2008; Sáez *et al.* 2012). Изследването показва, че само при *L. album*, култивиран на основна MS среда, вместо двуреден палисиден паренхим, както е при *in vivo* растенията, се формира лист с еднореден палисиден паренхим. От гледна точка на влиянието, което могат да оказват *in vitro* условията изобщо, това отклонение няма специфичен характер. Сравнителният хистологичен анализ на *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus*, култивирани в присъствие на **БА и ИМК, самостоятелно и комбинирано приложени**, показва, че влиянието на растежните регулатори върху

регенерационните процеси при листа най-силно зависи от вида, който се култивира. Морфометричните данни показват една обща и за трите вида тенденция - растежните регулатори водят до структуриране на лист и асимилационен паренхим с по-малка дебелина (Таблица 1, 2 и 3) и само при *L. album* комбинирано внесени в средата БА (0,2 мг/л) и ИМК (0,5 мг/л) водят до формиране на листа с по-голяма дебелина на асимилационния паренхим (Таблица 1). В анатомичното изследване бе обърнато голямо внимание на асимилационния паренхим, тъй като структурната му организация е важен маркер при оценка на регенерационния потенциал на растенията в *in vitro* условия. Сравнителният анализ показва, че при всеки от трите изследвани вида растежните регулатори влияят по различен начин върху структурирането на асимилационния паренхим. В условията на експеримента всяка морфологична характеристика на тъканно ниво е специфична и въпреки че изследваните видове са от едно семейство, при *in vitro* култивирането те се нуждаят от различни условия, които да осигурят най-успешна регенерация на растения, подходящи за адаптация в *ex vitro* условия. Асимилационният паренхим е тъканта, при която бе установено най-голямо морфологично разнообразие, пряко свързано с действието на БА и ИМК. В присъствие на **БА** при *L. album* се формират палисадни клетки със закръглена форма и големи междуклетъчни пространства (Фиг. 4, 5), при *O. stamineus* клетките са с вълновидни антиклинални стени и още по-силно редуциран структурен контакт (Фиг. 6, 7), докато при *L. cardiaca* този растежен регулатор не влияе върху структурирането на фотосинтезиращите тъкани. Формираният в присъствие на **ИМК** палисаден паренхим и при трите изследвани вида има други морфологични характеристики. При *L. album* палисадните клетки са къси и клиновидни, с малък структурен контакт (Фиг. 8), при *L. cardiaca* асимилационният паренхим е почти еднородно устроен (Фиг. 9), докато при *O. stamineus* тази тъкан е изградена от типични клетки с голям структурен контакт помежду им (Фиг. 10, 11). Анатомичното изследване показва, че едновременно внесени в средата,

растежните регулатори имат положителен ефект върху хистогенезата при *O. stamineus* (Фиг. 12, 13) и при *L. album* (Фиг. 14). След **комбинираното прилагане на БА и ИМК** в концентрации съответно 0,2 мг/л и 0,5 мг/л при *L. album* се формира лист, чиято структурна характеристика на асимилационния паренхим е най-близка до тази на *in vivo* растенията. Това е вариантът, при който на клетъчно и тъканно ниво изследваните растежни регулатори най-успешно подпомагат регенерационните процеси. Същевременно хистологичният анализ показва, че при *in vitro* култивиране на *L. cardiaca* не е необходимо използване на БА и ИМК или поне не в тези концентрации. Важна характеристика, пряко свързана с успешната регенерация и аклиматизация на *in vitro* култивираните растения, е структурната организация на епидермалните тъкани и преди всичко на устицата. Светлинномикроскопското изследване не установи нарушения в структурата на основните епидермални клетки, устичния комплекс и власинките при контролния вариант, както и при всички варианти с растежни регулатори в средата. Това е показател за генетичната стабилност на тези белези (Zhao *et al.* 2006) и е необходимо, но не и достатъчно условие за успешна регенерация на растенията. Резултатите показаха, че при видове от едно и също семейство БА и ИМК имат различна регулаторна роля в хистогенезата на епидермалните тъкани и най-вече върху един много важен за регенерацията на растенията в *in vitro* условия, както и за *ex vitro* адаптацията, структурен компонент – устицата. Важен структурен маркер, който трябва да бъде проследяван при *in vitro* растенията е устичната гъстота. Сравнителният анатомичен анализ показва, че растежните регулатори БА и ИМК могат да стимулират или да потиснат образуването на устица и по този начин съществено да повлияят хистогенезата на епидермалните тъкани. Растежните регулатори влияят най-силно върху формирането и броя на устицата при *O. stamineus* (Таблица 3). **БА** стимулира образуването на устица при адаксиалната епидерма и потиска образуването им при абаксиалната, което прави листа амфистоматичен (Фиг. 15, 16). Тази промяна в

хистогенезата на епидермата има уникален характер не само за условията на експеримента. Подобно отклонение в разпределението на устицата по листната повърхност под действие на растежни регулатори не е съобщавано за други *in vitro* култивирани растения. При същия вид **БА и ИМК в комбинация** също водят до неколккратно увеличаване на броя на устицата, но и при двете епидерми (Фиг. 17, 18, 19, 20). При *L. album* и *L. cardiaca* под действие на растежните регулатори устичната гъстота също варира, но в малки граници. Много изследвания показват, че повишената устичната гъстота при *in vitro* растенията е типична при тези условия (Blanke and Belcher 1989; Apóstolo and Llorente 2000; Decchetti *et al.* 2008; Sáez *et al.* 2012) затова би било съществен успех да се установи комбинация от растежни регулатори, която да регулира броя на устицата в подходящата посока и по този начин да осигури предимство на тези варианти за оцеляване в *ex vitro* условия. В настоящия експеримент не бяха установени растежни регулатори, които значително да понижават устичната гъстота при нито един от трите изследвани вида. Растежните регулатори влияят най-силно върху структурирането на епидермата при *O. stamineus*. Това изисква особено внимание към аклиматизацията на регенерантите и адаптацията им *ex vitro* тъй като повишената устична гъстота е една от причините за ниския процент на оцеляване в процеса на аклиматизация (Sáez *et al.* 2012). В анатомичното изследване внимание заслужава и фактът, че само при *L. cardiaca* **ИМК** стимулира образуването на по-голям брой жлезисти власинки (Фиг. 21, 22). Това може да се приеме като признак за преждевременно стареене на регенерантите (Jausoro *et al.* 2010) и е още едно потвърждение, че при този вид ИМК в условията на експеримента има негативен ефект върху хистогенезата.

Резултатите от анатомичното изследване на *in vitro* растенията от *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus* показаха, че при прилагане на растежни регулатори е необходимо да се изследва структурната организация както на автотрофните, така и на хетеротрофните тъкани при новообразуваните листа. За осъществяване на успешна регенерация

е необходимо хистологичният анализ да бъде част от изследванията при разработване на протокол за микроразмножаване на всеки конкретен вид.

За да бъде достатъчно информативно едно структурно изследване, то трябва да бъде комплексно и да включва както светлинномикроскопски, така и **ТЕМ-анализ** на фотосинтетичния апарат. При *in vitro* култивиране на растенията успешното им регенериране е пряко свързано със структурата на пластидния апарат във фотосинтезиращите тъкани на листа. Ултраструктурната организация на хлоропластите при *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus* е типична за напълно диференцирани фотосинтезиращи клетки. Сравнителният анализ показва, че при стандартни условията на *in vitro* култивиране в новообразуваните листа и на трите изследвани вида се формират хлоропласти с добре структурирана вътрешна мембранна система, типична пространствена ориентация на тилакоидите и малки скорбелни зърна в стромата при *L. cardiaca* и *O. stamineus* (Фиг. 23, 24). При много други изследвания са наблюдавани аномални елементи в хлоропластната архитектура като резултат от *in vitro* условията. Някои от тези условия най-често водят до неправилно структуриране на вътрешната мембранна система (Majada *et al.* 2002; Lucchesini *et al.* 2006; Jausoro *et al.* 2010) и силно увеличение на количеството на пластоглобулите в резултат на деструктивни изменения (Lucchesini *et al.* 2006; Ladygin *et al.* 2008). При условията на експеримента на субклетъчно ниво изследваните видове в голяма степен са реализирали своя морфогенетичен капацитет въпреки специфичните условия при микроразмножаването. Те успешно са регенерирали основни клетъчни компартменти. От друга страна в хлоропластите на изследваните от нас растения липсва скорбяла или има единични дребни скорбелни зърна, което е признак за намален фотосинтетичен капацитет на регенерантите в условията на миксотрофно хранене и специфични физични фактори на средата (Sáez *et al.* 2012). Резултатите от ТЕМ-анализа показваха, че БА и ИМК пряко влияят върху структурирането на пластидния апарат при *L.*



*album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus* и водят до формиране на специфична хлоропластна архитектура при всеки от изследваните видове. При сравнителен анализ на хлоропластната ултраструктура при новообразувани листа от трите вида бе установено, че **БА** има негативен ефект върху биогенезата на хлоропластите при *L. album* и *O. stamineus* като причинява сходни нарушения в тяхната структура – закръглени хлоропласти с деструктурирани тилакоиди (Фиг. 25, 26). Подобни характеристики са наблюдавани и при други растения в различни условия на *in vitro* култивиране (Ганева и съавт. 2009), както и при въздействие на различни стресови фактори (Stoyanova and Yordanov 1999). Тези данни показват, че става дума за универсална структурна реакция на хлоропластите при растения в условия на стрес. Резултатите от изследването показаха, че пластидният апарат на *in vitro* растенията от *L. cardiaca* е индиферентен към действието на този цитокинин и хлоропластите структурно не се различават от контролните растения. При същия вид обаче **ИМК** причинява специфични само за него структурни нарушения на хлоропластите - фрагментиране на стромалните тилакоиди (Фиг. 27). При останалите изследвани видове ИМК не влияе върху структурата на пластидния апарат. **Комбинираното прилагане на БА и ИМК** в експеримента предизвиква различен отговор на пластидния апарат при растенията от трите вида: закръгляне на хлоропластите и сливане на тилакоидите при *L. album* (Фиг. 28, 29); промяна на пространствената ориентация на вътрешната мембрана система без деструктивни характеристики при *L. cardiaca* (Фиг. 30, 31) и формиране на много добре структурирани хлоропласти с нормално оформени скорбелни зърна при *O. stamineus* (Фиг. 32). Тези резултати показаха, че в условията на експеримента само при комбинирано прилагане на растежните регулатори структурната организация на хлоропластите има специфичен характер. Организацията на пластидния апарат при *L. cardiaca*, формиран в присъствие на растежните регулатори БА и ИМК, е индикатор, че прилагането им при този вид не

само не е необходимо, но дори има негативно влияние върху формирането на хлоропластите.

Сравнителният анализ на анатомичните и ултраструктурните резултати показва, че едновременно добре структуриран фотосинтезиращ апарат на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво се реализира само при *in vitro* растения от *O. stamineus* в присъствие и на двата растежни регулатора. При *L. cardiaca* внасянето на растежни регулатори влияе негативно върху хистогенезата както на тъканно, така и на субклетъчно ниво и нито един структурен маркер не показва необходимост от прилагането им. При *L. album* комбинирано приложени растежните регулатори БА и ИМК в концентрации съответно 0,2 мг/л и 0,5 мг/л влияят положително върху структурирането на асимилационния паренхим, но не и на пластидния апарат.

Сравнителният анализ на всички установени резултати за *L. album*, *L. cardiaca* и *O. stamineus* в условията на експеримента показва, че е необходимо комплексно структурно изследване на листа при всеки вид, въвеждан в култура. То позволява да се оптимизира протокола за микроразмножаване и *ex vitro* адаптация чрез обосновани изводи за необходимостта от прилагане на растежни регулатори и подходящото съотношение, в което да бъде направено това. Установяването на разнопосочност на структурните резултати при три вида от едно семейство (Lamiaceae) на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво е индикатор за необходимост от разширяване на изследването чрез тестване на БА и ИМК в друг концентрационен диапазон, в други варианти на комбиниране и на нови растежни регулатори с една цел – успешно *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптация.

## ИЗВОДИ

Сравнителният анализ на резултатите от структурното изследване на лист при *in vitro* култивирани растения от *Lamium album*, *Leonurus cardiaca* и *Orthosiphon stamineus* позволява да се направят следните общи и за трите изследвани вида изводи за влиянието на условията в експеримента върху организацията на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво при новоформираните листа:

1. Растенията от изследваните видове, въведени в култура на стандартна MS среда, на клетъчно и тъканно ниво формират листа с устойчива и независеща от *in vitro* условията структура с типичните за бифациален лист характеристики.

2. В присъствие на растежните регулатори БА и ИМК в хранителната среда *in vitro* растенията и от трите вида формират листа с по-малка дебелина на петурата в сравнение с контролните растения. Само при *L. album* растенията, регенерирани на среда с БА и ИМК в концентрации съответно 0,2 мг/л и 0,5 мг/л имат листа с по-голяма дебелина на асимилационния паренхим и съответно на петурата.

3. Растежните регулатори БА и ИМК контролират пряко структурирането на асимилационния паренхим и устичната гъстота и са фактор, който определя различията в морфологичната характеристика на тъканно ниво в пряка зависимост от растителния вид. Лист с най-добре структуриран асимилационен паренхим се формира при *O. stamineus* в присъствие и на двата растежни регулатора.

4. На субклетъчно ниво и при трите изследвани вида растенията, култивирани на стандартна MS среда, се характеризират с успешно регенерирани клетъчни компартменти. При изследваните видове присъствието на БА и ИМК в култивационната среда определя структурната организация на пластидния апарат. В условията на експеримента новоформираните листа при растения от *L. album* и *O. stamineus* в присъствие на БА имат хлоропласти в състояние на деструкция и ефектът на този растежен регулатор е негативен. Най-

добре структуриран е пластидният апарат при *O. stamineus* в листа, формирани в присъствие и на двата растежни регулатора.

5. Сравнителното изследване показва, че в условията на експеримента най-добре структуриран фотосинтетичен апарат на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво имат регенерираните растения от *O. stamineus* с добавени в средата комбинирано БА и ИМК.

6. Структурното изследване на листа от регенерирани растения от *L. cardiaca* в среда с добавени самостоятелно и комбинирано БА и ИМК не установи нито един структурен маркер, който да показва необходимост от използването на тези растежни регулатори.

7. Комплексното структурно изследване на три вида от едно и също семейство показва, че в условията на *in vitro* култивиране под въздействие на растежни регулатори е напълно възможно да се получат разнопосочни резултати за организацията на фотосинтетичния апарат и това бе установено при *L. album*. Комбинирането на БА и ИМК в концентрации съответно 0,2 мг/л и 0,5 мг/л има положителен ефект върху хистогенезата на асимилационния паренхим и негативен ефект върху структурирането на пластидния апарат.

8. Резултатите на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво, получени за *in vitro* култивираните растения от *L. album*, *L. cardiaca*, и *O. stamineus* чрез методите на светлинната и трансмисионната електронна микроскопия, доказват необходимостта от комплексно структурно изследване като достатъчно информативно за регенерационния потенциал на всеки вид, въвеждан в култура, а разнопосочният им характер е индикатор за необходимост от разширяване на изследването. Това ще направи протокола за *in vitro* размножаване по-надежден и ще гарантира успешна *ex vitro* адаптация на всеки вид.

## Справка за приносите на дисертацията

1. За първи път е осъществено комплексно структурно изследване на лист при *in vitro* растения от *Lamium album*, *Leonurus cardiaca* и *Orthosiphon stamineus* (сем. Lamiaceae), култивирани на основна (MS) среда и на среда с добавени растежни регулатори.

2. Установени са структурните характеристики на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво на лист, регенериран в *in vitro* условия и за първи път е определено влиянието на БА и ИМК върху хистогенезата на епидермалните тъкани и асимилационния паренхим и формирането на пластидния апарат.

3. Потвърдено е, че растежните регулатори БА и ИМК са фактор, който контролира структурирането на палисадния паренхим, устичната гъстота и организацията на мембрания компартмент при хлоропластите на *in vitro* култивираните растения.

4. Доказано е специфичното влияние на БА и ИМК върху хистогенезата на листа и структурирането на пластидния апарат в пряка зависимост от растителния вид, въвеждан в *in vitro* култура и от начина, по който се прилагат растежните регулатори, като е установено, че:

- стандартните *in vitro* условия и растежните регулатори не променят архитектурата на новообразуваните листа на изследваните видове, но при *L. cardiaca* ИМК води до структуриране на почти еднороден асимилационен паренхим, а при *L. album* в условията на експеримента се формира еднореден палисаден паренхим вместо двуреден;
- растежните регулатори влияят върху устичната гъстота само при *O. stamineus*;
- комбинирано приложени БА и ИМК са необходимо условие за добре структуриран фотосинтетичен апарат на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво само при *O. stamineus*;

- при *L. cardiaca* резултатите от структурното изследване не показват необходимост от прилагане на БА и ИМК;
- БА и ИМК влияят пряко и видовоспецифично върху структурната организация на пластидния апарат като са причина за атипична пространствена ориентация на вътрешната мембранна система, форми на деструкция на тилакоидите и само при *O. stamineus* комбинирано приложени водят до типично структурирани хлоропласти;
- само при *L. album* в присъствие и на двата растежни регулатора резултатите на тъканно и субклетъчно ниво имат разнопосочен характер.

5. Доказана е необходимостта от комплексно структурно изследване на лист като достатъчно информативно за установяване на регенерационния потенциал на въведените в *in vitro* култура видове.

6. Практическото измерение на резултатите от структурното изследване е използването им като задължителен маркер за създаване на ефективен протокол за *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптация за всеки вид, въвеждан в *in vitro* култура.

## Научни публикации и участия в научни форуми

Публикации в научни списания

**Stefanova M. A.**, Koleva D. P., Ganeva Ts. G., Dimitrova M. A., 2011, Effect of plant growth regulators on the regeneration of *in vitro*-propagated *Lamium album* L. plants. **Journal of Pharmacy Research** 4(7):1982-1985

**Stefanova M.**, Koleva D., Ganeva Ts., 2013 (in press), Effect of plant growth regulators on chloroplast ultrastructure in *Lamium album* L. plantlets. **Bulgarian Journal of Agricultural Science** IF 0.189

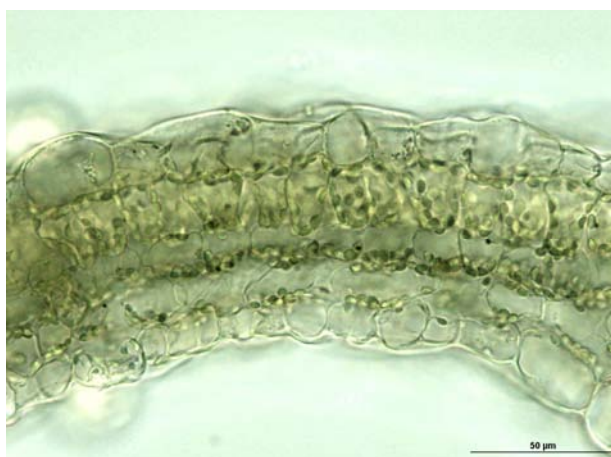
Участия в научни конференции

Ganeva, Ts., **Stefanova, M.**, Uzunova, K., Koleva, D., 2009, Structural responses of photosynthetic apparatus of *Orthosiphon stamineus* Benth. to temperature stress after cryopreservation. 5<sup>th</sup> Balkan Botanical Congress, 80<sup>th</sup> Anniversary of the publication of Turrill's "Plant Life of the Balkan Peninsula", Belgrade, Serbia, 7-11.09.2009 г.

Ганева, Ц., Димитрова, М., Неделкова, Я., Йорданова, Ж., **Стефанова, М.**, 2010, Effect of plant growth regulators on the leaf anatomy of *in vitro* propagated *Lamium album* L. plants. Младежка Научна Конференция „Климентови дни“, 22-23 ноември, 2010 г., София

**Стефанова, М.**, Колева, Д., 2011, Влияние на бензиладенин и индолмаслена киселина върху ултраструктурата на хлоропластите на *in vitro* култивирани растения от *Lamium album*. VII-ма Национална конференция по ботаника, 29-30 септември, 2011 г., София

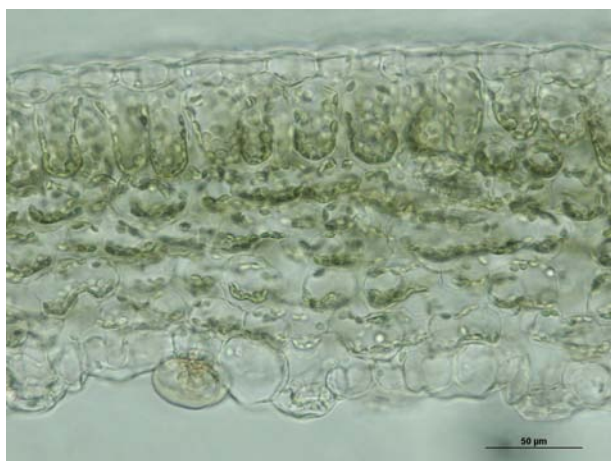
## Приложение



**Фиг. 1.** *L. album* - контролен вариант



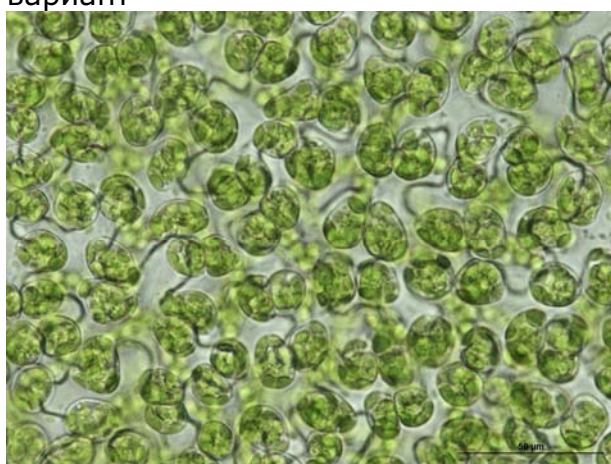
**Фиг. 2.** *L. cardiaca* - контролен вариант



**Фиг. 3.** *O. stamineus* - контролен вариант



**Фиг. 4.** *L. album* - 0,2 мг/л БА

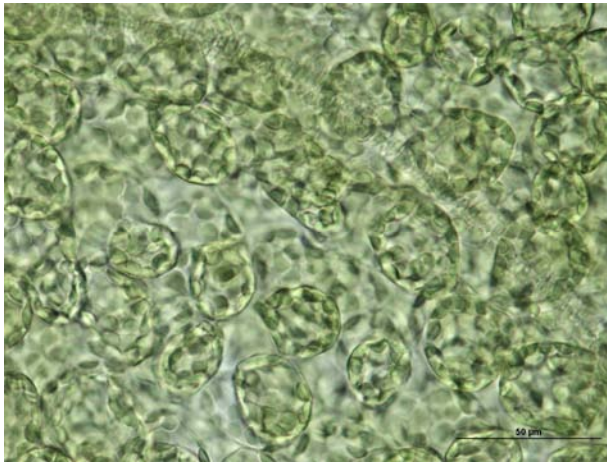


**Фиг. 5.** *L. album* - 0,2 мг/л БА



**Фиг. 6.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА





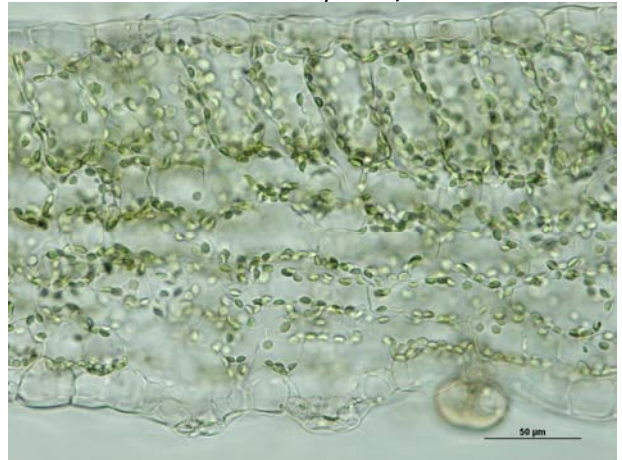
**Фиг. 7.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА



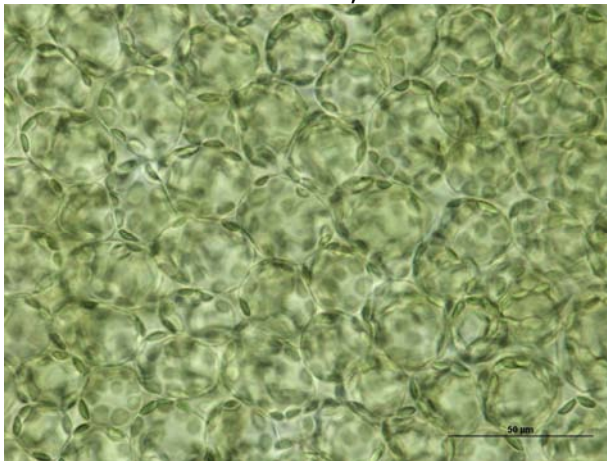
**Фиг. 8.** *L. album* – 0,5 мг/л ИМК



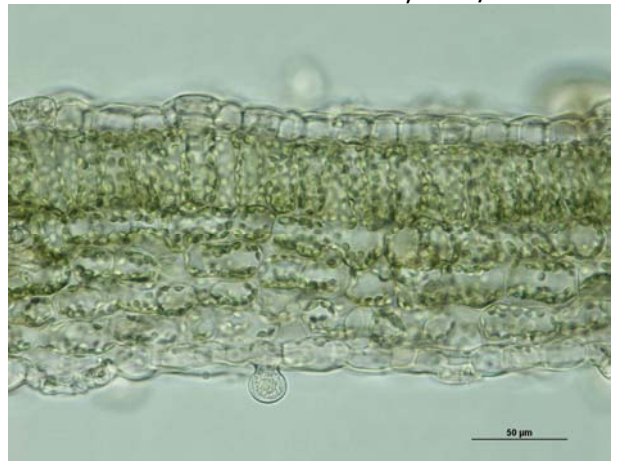
**Фиг. 9.** *L. cardiaca* – 0,4 ИМК



**Фиг. 10.** *O. stamineus* - 0,9 мг/л ИМК



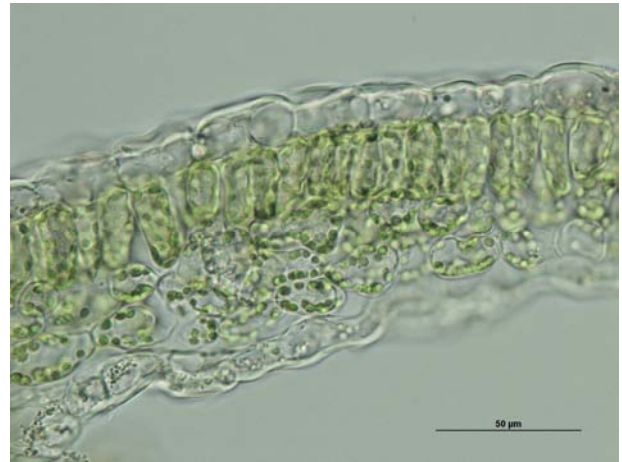
**Фиг. 11.** *O. stamineus* - 0,9 мг/л ИМК



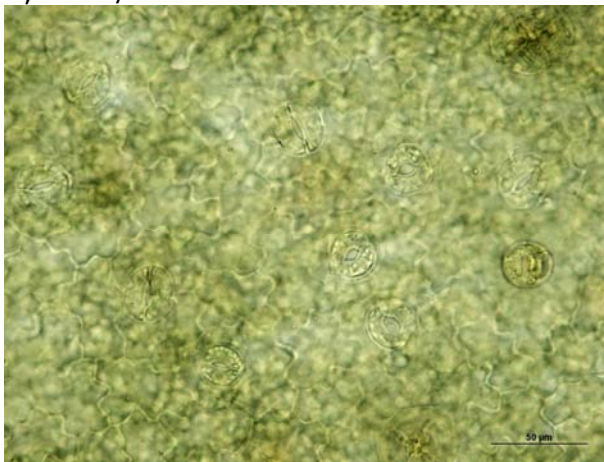
**Фиг. 12.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА + 0,9 мг/л ИМК



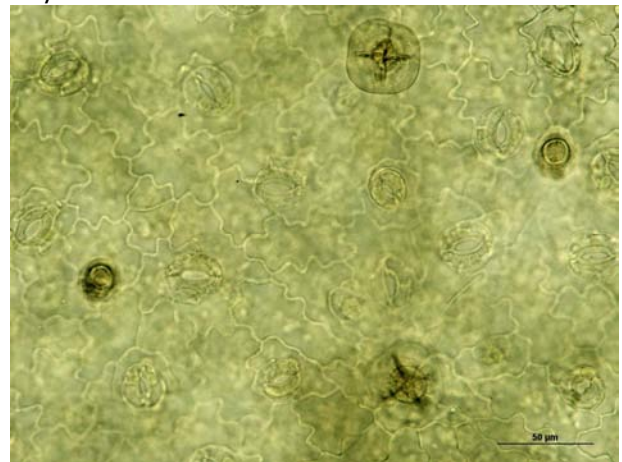
**Фиг. 13.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА + 0,09 мг/л ИМК



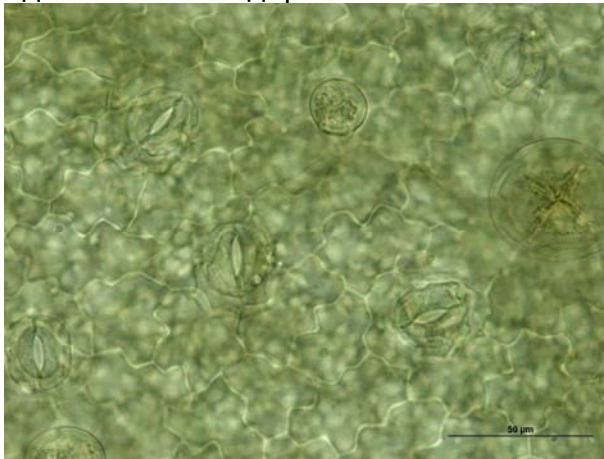
**Фиг. 14.** *L. album* - 0,2 мг/л БА + 0,5 мг/л ИМК



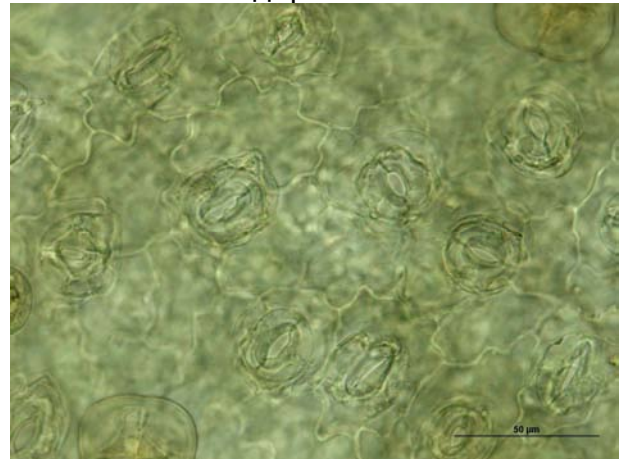
**Фиг. 15.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА - адаксиална епидерма



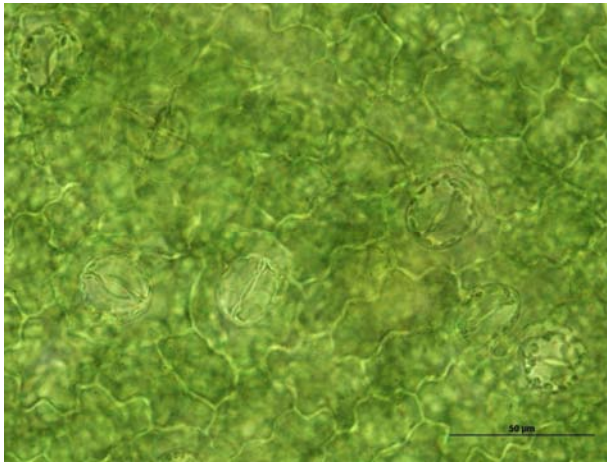
**Фиг. 16.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА - абаксиална епидерма



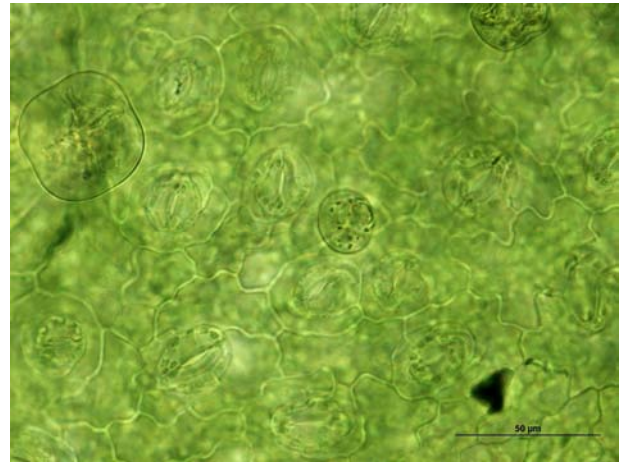
**Фиг. 17.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА + 0,9 мг/л ИМК - адаксиална епидерма



**Фиг. 18.** *O. stamineus* - 0,1 мг/л БА + 0,9 мг/л ИМК - абаксиална епидерма



**Фиг. 19.** *O. stamineus* – 0,1 мг/л БА + 0,09 мг/л ИМК - адаксиална епидерма



**Фиг. 20.** *O. stamineus* – 0,1 мг/л БА + 0,09 мг/л ИМК - абаксиална епидерма



**Фиг. 21.** *L. cardiaca* - контролен вариант



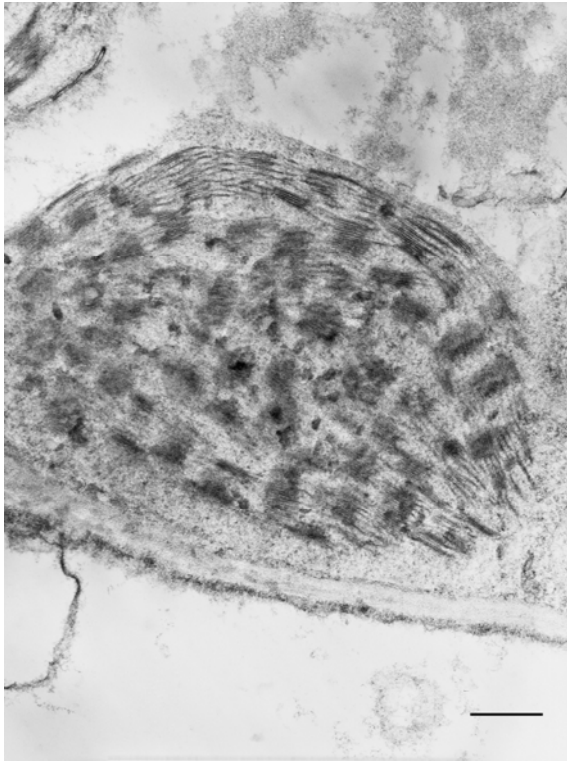
**Фиг. 22.** *L. cardiaca* – 0,4 мг/л ИМК



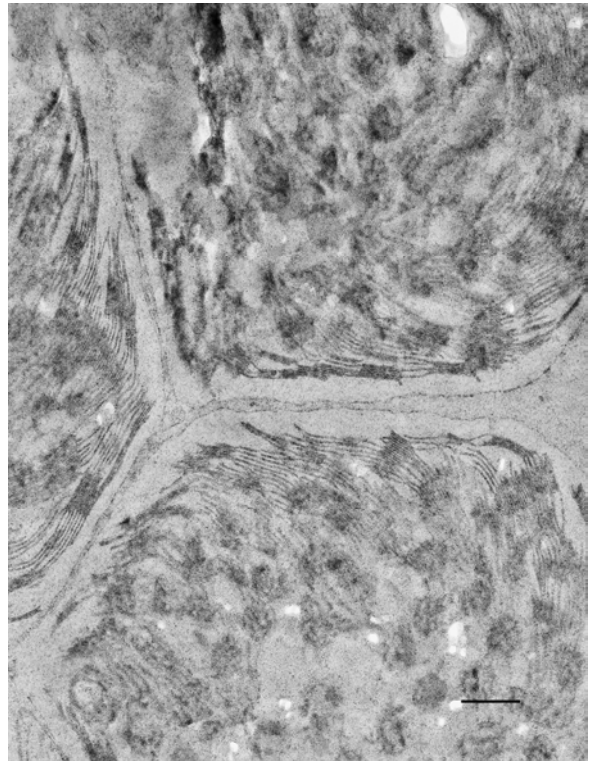
**Фиг. 23.** *L. cardiaca* - контролен вариант



**Фиг. 24.** *O. stamineus* – контролен вариант



**Фиг. 25.** *L. album* – 0,2 мг/л БА



**Фиг. 26.** *O. stamineus* – 0,1 мг/л БА



**Фиг. 27.** *L. cardiaca* – 0,4 мг/л ИМК



**Фиг. 28.** *L. album* – 0,2 мг/л БА + 0,5 мг/л ИМК



**Фиг. 29.** *L. album* – 0,2 мг/л БА + 0,05 мг/л ИМК



**Фиг. 30.** *L. cardiaca* – 0,3 мг/л БА + 0,4 мг/л ИМК



**Фиг. 31.** *L. cardiaca* – 0,3 мг/л БА + 0,04 мг/л ИМК



**Фиг. 32.** *O. stamineus* – 0,1 мг/л БА + 0,9 мг/л ИМК

**Таблица 1.** Морфометрични данни за фотосинтезиращите и епидермалните тъкани на листа и коефициент на палисадност при *in vitro* култивирани растения от *L. albita* на стандартна MS хранителна среда и на среди с добавени растежни регулатори. Между средните стойностите на всеки параметър, последвани от една и съща буква, няма статистически достоверна разлика при  $P < 0,05$ .

Параметър	Контрола	БА (0,2 мг/л)	ИМК (0,5 мг/л)	БА (0,2мг/л)+ ИМК(0,5мг/л)	БА (0,2мг/л)+ ИМК(0,05мг/л)
Дебелина на листна петура (мкм)	70,50±13,76a	64,50±5,92a	62,33±4,38a	76,17±7,43bc	68,83±5,16ac
Дебелина на асимилационен паренхим (мкм)	42,83±10,47ac	35,67±4,48a	37,33±4,06ad	49,00±6,32be	41,67±4,30cde
Дебелина на палисаден паренхим (мкм)	19,33±3,20a	18,33±2,44a	18,50±1,84a	22,17±1,86bc	19,67±1,60ac
Дебелина на гъбчест паренхим (мкм)	23,67±7,73ad	17,33±3,20bc	18,83±3,39ac	27,00±5,76d	21,83±3,47abd
Коефициент на палисадност (%)	45	51	50	45	47
Дебелина на адаксиална епидерма (мкм)	15,33±2,81a	7,39±1,85b	12,00±1,40c	13,00±1,69ac	14,33±2,00ac
Дебелина на абаксиална епидерма (мкм)	12,00±1,69a	15,00±1,89bc	12,50±1,89a	14,33±3,20ac	13,00±2,35ac
Брой устица при адаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	3a	0a	5a	1a	0a
Брой устица при абаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	154a	106b	95b	114b	152a

**Таблица 2.** Морфометрични данни за фотосинтезиращите и епидермалните тъкани на листа и коефициент на палисадност при *in vitro* култивирани растения от *L. scardiasa* на стандартна MS хранителна среда и на среди с добавени растежни регулатори. Между средните стойностите на всеки параметър, последвани от една и съща буква, няма статистически достоверна разлика при  $P < 0,05$ .

Параметър	Контрола	БА (0.3мг/л)	ИМК (0.4мг/л)	БА (0.3мг/л)+ ИМК(0.4мг/л)	БА (0.3мг/л)+ ИМК(0.04мг/л)
Дебелина на листна петура (мкм)	59,67±4,10a	53,17±2,21b	51,50±3,11b	60,17±3,34a	60,67±3,20a
Дебелина на асимилационен паренхим (мкм)	37,17±3,26a	33,33±2,44b	33,50±2,80bc	36,83±2,40a	36,67±3,09ac
Дебелина на палисаден паренхим (мкм)	15,67±2,00ad	13,83±1,29ac	12,50±1,64bc	16,67±2,62d	15,83±2,25ad
Дебелина на гъбчест паренхим (мкм)	21,17±3,39a	19,00±1,84a	20,16±2,58a	20,50±1,94a	20,67±2,58a
Коефициент на палисадност (%)	43	42	38	45	43
Дебелина на адаксиална епидерма (мкм)	11,17±2,08a	9,33±1,76a	10,50±2,15a	11,67±2,62a	10,83±2,44a
Дебелина на абаксиална епидерма (мкм)	9,67±2,48a	7,50±1,89ac	7,00±1,69bcd	8,00±2,35ad	8,50±1,84ab
Брой устица при адаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	0	0	0	0	0
Брой устица при абаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	209ac	169bd	236a	195cd	136e

**Таблица 3.** Морфометрични данни за фотосинтезиращите и епидермалните тъкани на листа и коефициент на палисадност при *in vitro* култивирани растения от *O. stamineus* на стандартна MS хранителна среда и на среди с добавени растежни регулатори. Между средните стойностите на всеки параметър, последвани от една и съща буква, няма статистически достоверна разлика при  $P < 0,05$ .

Параметър	Контрола	БА (0,1 мг/л)	ИМК (0,9 мг/л)	БА (0,1мг/л)+ ИМК(0,9мг/л)	БА (0,1мг/л)+ ИМК(0,09мг/л)
Дебелина на листна петура (мкм)	170,50±20,38a	157,67±20,95a	154,83±18,01a	126,33±11,29b	123,17±4,77b
Дебелина на асимилационен паренхим (мкм)	147,83±10,30a	134,00±16,20a	124,00±18,54a	96,33±11,98b	93,00±6,63b
Дебелина на палисаден паренхим (мкм)	52,33±8,99a	52,50±5,59a	52,50±4,01a	39,83±4,38b	36,17±4,10b
Дебелина на гъбчест паренхим (мкм)	87,00±13,37a	83,00±16,40a	70,83±12,63b	61,67±7,30bc	57,17±6,11c
Коефициент на палисадност (%)	38	39	43	39	39
Дебелина на адаксиална епидерма (мкм)	16,33±2,29ab	17,33±1,76a	16,67±1,81ac	14,33±1,76b	14,67±2,29bc
Дебелина на абаксиална епидерма (мкм)	20,33±3,11ab	21,33±2,08a	20,00±2,11ab	17,17±2,08bc	14,83±2,00c
Брой устица при адаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	1a	85b	6a	76b	83b
Брой устица при абаксиална епидерма (бр/мм <sup>2</sup> )	164ac	72b	101ab	238cd	286d



## **Благодарности**

*Изключително признателна съм на научния си ръководител доц. д-р Димитрина Колева за предоставената възможност за развитие, експертното ръководство и безрезервната помощ при осъществяването на настоящата работа. Благодаря на колегите от Лабораторията по растителни биотехнологии към Катедрата по физиология на растенията при БФ за осигурения *in vitro* растителен материал и лично на нейния ръководител проф. д-р Венета Капчина-Тотева за споделените знания и опит в областта на микроразмножаването на растенията; на доц. д-р Елена Чакалова, доц. д-р Петка Юркова-Грънчарова, доц. д-р Анна Ганева, доц. д-р Красимира Узунова и гл. ас. д-р Цвета Ганева за ценните съвети и подкрепата, които получих при изработването и оформянето на настоящата дисертация; на колегите от Катедрата по ботаника за консултациите и съдействието при съвместната ни работа.*